

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Sénescence induite prématurément par les stress subcytotoxiques sous UVB et apolipoprotéine J

Borlon, Celine

Award date:
2002

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS SUBCYTOTOXIQUES SOUS
U.V.B ET APOLIPOPROTEINE J**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Céline BORLON

Juin 2002

FM B4/2002/4

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

—
Bibliothèque



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS SUBCYTOTOXIQUES SOUS
U.V.B ET APOLIPOPROTEINE J**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Céline BORLON

Juin 2002

VRS 20045911

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Sénescence induite prématurément par les stress subcytotoxiques sous U.V.B et apolipoprotéine J

BORLON Céline

Résumé

Divers travaux ont montré que l'exposition répétée de cellules prolifératives jeunes humaines à de faibles doses d'agents stressants, induisait l'apparition chez ces cellules d'une série de biomarqueurs de la sénescence répllicative. Cet état a été décrit comme une sénescence induite prématurément par des stress.

Lors de ce travail, nous avons étudié un nouveau modèle de SIPS suite à des stress répétés et subcytotoxiques aux rayons ultraviolets B sur des fibroblastes jeunes humains de peau en culture de souche FS. Nous avons montré l'apparition, à long terme après les stress, de l'activité de la SA- β gal, d'un arrêt de la prolifération ainsi que l'augmentation du niveau relatif de transcrit de 2 gènes connus pour être exprimés lors de la sénescence répllicative : l'apolipoprotéine J et l'ostéonectine. Par western blot, nous avons montré que le niveau d'expression de la protéine apolipoprotéine J augmentait également. Etant donné une fonction connue de l'apolipoprotéine J dans la protection de stress de différentes natures, nous avons sous-cloné l'ADN_c de l'apolipoprotéine J portant un "tag" 6His/V5 ou non, dans divers vecteurs en vue de construire finalement un vecteur rétroviral permettant une expression stable dans des fibroblastes normaux. La construction intermédiaire, dans le vecteur pcDNA3.1.A, servant à greffer le "tag", a été transfectée de façon transitoire dans les cellules COS et de façon stable dans les fibroblastes immortalisés SV-40. Nous avons mis en évidence par western blot la présence de la protéine "taggée" au sein des cellules et dans leur surnageant. Enfin, nous avons terminé la construction du vecteur rétroviral qui permettra après transfection dans les fibroblastes FS et sélection, de tester les effets de l'apo J dans des conditions de stress cytotoxiques et subcytotoxiques sous U.V.B.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur : O. TOUSSAINT

Quatre ans déjà... que de bons moments mais tout est passé si vite!

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation et m'ont encouragée durant ces années d'étude.

En premier lieu, madame le professeur Raes, qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire.

Merci à toi Olivier, de m'avoir accueillie dans ton équipe. Ton sourire, tes mots d'encouragement ont fait de ce travail un réel plaisir, et au moindre problème ou question... ta porte était toujours ouverte!

Florence, un tout grand merci de m'avoir suivie comme tu l'as fait. Ta patience, tes conseils, ton aide furent pour moi un vrai trésor. Tu as été ces derniers mois "ma petite maman Florence". Je n'oublierai en tout cas jamais qu'aucune cause désespérée ne résiste à quelques petits bonbons et surtout aux roses à Sainte Rita!

Merci à vous tous les petits "GRAS". Jeanjean, Tcherry, Friedel, Steph, Véro, Michel et tous les autres, pour les conseils, réponses aux questions existentielles, aide dans les moments cruciaux et puis tous les petits délassements!

Merci à vous les URBCéens, pour votre accueil au sein du labo. On était beaucoup de mémorants et tout le monde y a mis du sien! Un merci tout spécial à toi, Anne-France, toujours présente au bon moment avec tes encouragements et ton aide si précieuse dans les moments délicats. Une seconde mention spéciale à toi Edouard pour ton aide lors de mes débuts chaotiques du western. Et pour terminer les mentions spéciales, merci "monsieur Marc", on plantait toujours les ordis et toi inlassablement tu remettais tout en ordre!

Je ne saurais oublier le bureau des fratellos pour toutes les petites pauses agrémentées de votre humour!

Et puis vous tous, les mémorants d'URBC...

Tout d'abord Aline et Sophie, mes coéquipières chez les "GRAS", un tout grand merci pour tout : aide, écoute, confiance, solidarité et puis les si bons petits desserts...

Merci à toi Val, pour ta confiance, tes petits coups de pouce, ton génie à détecter les failles, tes conseils...

Merci Marie pour les "redacs by night", on s'en souviendra!

Merci Ludo, pour ta spontanéité et toutes tes blagues, les citations de J.C.V.D resteront longtemps gravées dans nos mémoires!

Merci aussi à toi Christelle que j'ai appris à mieux connaître ces derniers mois ("Ne fais plus ta maligne", le fameux bide, les 41 minutes,...)

Merci aussi à tous les autres, Cindy, Maud, Catou, Marina, Katy, Delphine, Manu, Julien, Papy, Sébastien, pour l'ambiance au sein de notre "cage aux mémorants", les surnoms dans "STUDENT", les fous rires,...

Bonne route à vous tous pour la suite!

Merci à vous tous mes amis, Gégé, Marie, Valérie, Plage, Anne-Laure, Phil et tous les autres... Un merci tout spécial à toi Gégé, car tu as toujours été là quand j'en avais besoin, merci pour nos nombreux délires, pour tous nos petits voyages (promis l'année prochaine, on remet ça!).

Merci aussi à tout le staff nuton... Avec vous, la détente bien nécessaire était toujours au rendez-vous!

Je ne saurais terminer sans vous remercier, vous mes parents de m'avoir permis de réaliser ces études et de m'avoir soutenue jusqu'au bout. Merci aussi à vous mes sœurs, Mélanie, Floriane et Emeline de m'avoir supportée dans les moments les plus durs...la bloquer! Fini maintenant, bonne route, ce sera bientôt votre tour...

Céline

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
A	adénine
A	ampère
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN _c	acide désoxyribonucléique complémentaire
Amp ^r	résistance à l'ampicilline
Apo J	apolipoprotéine J
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine tri phosphates
β-gal	β-galactosidase
BME	basal medium eagle
BSA	bovine sérum albumine
°C	degré celcius
CaCl ₂	chlorure de calcium
CDKIs	cycline dependant kinases inhibitors
CDKs	cycline dependant kinases
CLE	clusterin element
C _t	threshold cycle
CTL	contrôle
D.O.	densité optique
DCPs	doublements cumulés de population
dH ₂ O	eau distillée
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dl-dithiothreitol
<i>E. Coli</i>	<i>E.scherichia Coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EtOH	éthanol
FBS	foetal bovine serum
FHDs	fibroblastes humains diploïdes
g	gramme
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBP	highly basic protein
HDL	high density lipoprotein
J	joule
J0	jour zéro
kb	kilo paires de bases
kDa	kilo dalton
l	litre
LB	luria bertani
LTR	long terminal repeat
μ	micro
m	milli
m	mètre
M	molaire
M.W.	molecular weight marker

MEM	minimum essential medium
MF	mitotic fibroblast
n	nano
néo ^r	résistance à la néomycine
NTC	no template control
pb	paire de bases
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PMF	post mitotic fibroblast
pRb	protéine de rétinoblastome
PVDF	polyvinylidène difluoride
rpm	rotation par minute
RT	rétro-transcription
SA-βgal	sénescence associated β-galactosidase
SDS	sodium dodécyl sulfate
sHSP	small Heat Shock Protein
SIPS	Sénescence Induite Prématûrement par les Stress
SR	Sénescence Réplicative
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
T	thymine
TBE	tris borate EDTA
t-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TBS-t	tris buffer saline-tween
Tm	température de melting
TRF	terminal restriction fragment
U	unité enzymatique
U.V.	ultraviolet
U.V.A.	ultraviolet de type A
U.V.B.	ultraviolet de type B
U.V.C.	ultraviolet de type C
V	volt
v:v	volume:volume
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

Table des matières

I	INTRODUCTION.....	1
I.1	Sénescence répllicative et SIPS.....	1
I.1.1	La sénescence répllicative.....	1
I.1.2	La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS).....	2
I.2	Les biomarqueurs de la sénescence.....	3
I.2.1	Les morphotypes.....	3
I.2.2	L'activité β -galactosidase associée à la sénescence.....	4
I.2.3	L'altération du génome mitochondrial.....	5
I.2.4	Le raccourcissement des télomères.....	5
I.2.5	Régulation et arrêt du cycle cellulaire.....	6
I.2.5.1	Répression de certains gènes de réponse précoce aux mitogènes.....	7
I.2.5.2	Répression des gènes de la phase G1/S.....	7
I.2.5.3	Répression des cyclines et kinases dépendantes de cyclines.....	8
I.2.5.4	Expression d'inhibiteurs de complexes cyclines-CDKs (=CDKIs).....	8
I.2.6	La réplication de l'ADN.....	9
I.2.7	Modulation de l'expression génique.....	9
I.3	Dommages entraînés par les radiations ultra-violettes au niveau de l'ADN.....	9
I.3.1	Dommages directs entraînés au niveau de l'ADN par des radiations U.V.	10
I.3.2	Dommages indirects entraînés au niveau de l'ADN par des radiations U.V.	11
I.3.3	Conséquences biologiques des dommages induits par les radiations U.V.....	12
I.4	L'apolipoprotéine J (apo J)	12
I.5	Transfection rétrovirale.	14
I.6	La real time PCR.....	16
I.7	But du mémoire	18
II	MATERIELS ET METHODES.....	19
II.1	Culture cellulaire	19
II.1.1	Culture de fibroblastes FS	19
II.1.1.1	Repiquage des fibroblastes FS.....	19
II.1.1.1.1	Matériel.....	19
II.1.1.1.2	Méthode	20
II.1.1.2	Congélation et décongélation des fibroblastes FS	20
II.1.1.2.1	Préparation des solutions.....	20
II.1.1.2.2	Congélation	20
II.1.1.2.3	Décongélation des fibroblastes	21

II.1.2	Culture des fibroblastes SV40	21
II.1.2.1	Repiquage des fibroblastes SV40	21
II.1.2.1.1	Matériel.....	21
II.1.2.1.2	Méthode.....	22
II.1.2.2	Congélation et décongélation des fibroblastes SV40.....	22
II.1.3	Culture des cellules COS	22
II.1.3.1	Matériel.....	22
II.1.3.2	Méthode	22
II.2	Stress subcytotoxiques aux U.V.B.....	23
II.2.1	Matériel.....	23
II.2.2	Méthode	23
II.3	Stress cytotoxiques à l'éthanol, au t-BHP et aux U.V.B.....	23
II.3.1	Matériel	23
II.3.2	Méthode	24
II.3.2.1	Stress au t-BHP et à l'EtOH	24
II.3.2.2	Stress aux U.V.B	24
II.4	Transfection cellulaire.....	24
II.4.1	Transfection au Superfect	25
II.4.1.1	Matériel.....	25
II.4.1.2	Méthode	25
II.4.2	Transfection à la phosphatase alcaline	25
II.4.2.1	Matériel.....	26
II.4.2.2	Préparation des solutions.....	26
II.4.2.3	Méthode	26
II.4.3	Coloration β -gal pour le vecteur LacZ	27
II.4.3.1	Matériel.....	27
II.4.3.2	Méthode	27
II.5	Dosage de protéines	27
II.5.1	Méthode inverse	27
II.5.1.1	Principe	27
II.5.1.2	Matériel.....	28
II.5.1.3	Méthode	28
II.5.2	Méthode de Lowry	29
II.5.2.1	Matériel.....	29
II.5.2.2	Méthode	29
II.6	Détection des biomarqueurs de la sénescence	30
II.6.1	Activité SA- β -gal	30
II.6.1.1	Matériel.....	30

II.6.1.1.1	Solution de fixation.....	30
II.6.1.1.2	Solution de coloration.....	30
II.6.1.1.3	Traitement des cellules	31
II.6.1.2	Méthode	31
II.6.2	Incorporation de la [3H]-thymidine.....	31
II.6.2.1	Matériel.....	31
II.6.2.2	Méthode	32
II.7	Concentration de protéines.....	32
II.8	Western blot.....	33
II.8.1	Principe	33
II.8.2	Méthode	33
II.8.2.1	Récupération des extraits et préparation des échantillons	33
II.8.2.1.1	Récupération des extraits.....	33
II.8.2.1.2	Préparation des échantillons	34
II.8.2.2	Préparation des gels et migration.....	34
II.8.2.3	Transfert sur membrane PDVF.....	35
II.8.2.4	Le blocking.....	35
II.8.2.5	Anticorps primaires	35
II.8.2.6	Anticorps secondaires	36
II.8.2.7	Révélation.....	36
II.8.2.8	« Stripping » de la membrane	36
II.9	Plasmides et souche bactérienne	36
II.9.1	Plasmides	36
II.9.1.1	Le pcDNA3.1 6 His/V5.....	36
II.9.1.2	Le pcDNA3.1.A-LacZ.....	37
II.9.1.3	Le pLXSN.....	37
II.9.2	Souche bactérienne.....	38
II.9.2.1	Matériel.....	38
II.9.2.2	Préparation des milieux de culture.....	38
II.9.2.2.1	Le milieu Luria Bertani (LB).....	38
II.9.2.3	Préparation des bactéries CaCl ₂ compétentes	39
II.9.2.4	Transformation bactérienne par la méthode du choc thermique	39
II.10	Extraction ADN plasmidique	40
II.10.1	Mini préparation d'ADN plasmidique.....	40
II.10.1.1	Solutions	40
II.10.1.2	Méthode	41
II.10.2	Maxi préparation d'ADN plasmidique.....	41
II.10.2.1	Solutions et tampons	42
II.10.2.2	Méthode	42

II.11	Restriction-ligation d'ADN.....	44
II.11.1	Restriction d'ADN.....	44
II.11.1.1	Mélange de restriction.....	44
II.11.2	Réaction de ligation.....	44
II.11.2.1	Méthode.....	44
II.12	Clonage TOPO TA.....	45
II.12.1	Constituants du kit.....	45
II.12.2	Réalisation du « A-tailing ».....	45
II.12.3	Réalisation du TOPO TA cloning.....	46
II.13	Séquençage.....	46
II.13.1	Préparation du mix pour le séquençage.....	47
II.14	Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	47
II.14.1	Clonage par PCR.....	48
II.14.2	PCR de criblage.....	48
II.14.3	Préparation du mélange réactionnel.....	48
II.14.4	Programmation des cycles PCR.....	48
II.14.4.1	Premier type (Pfu polymérase).....	49
II.14.4.2	Deuxième type (Taq polymérase).....	49
II.14.5	Vérification du produit PCR.....	49
II.15	Electrophorèse en gel d'agarose.....	49
II.15.1	Matériel.....	50
II.15.2	Méthode.....	50
II.16	Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT PCR)...	51
II.16.1	Principe.....	51
II.16.2	Méthode.....	52
II.16.2.1	Extraction de l'ARN des cellules.....	52
II.16.2.1.1	Matériel.....	52
II.16.2.1.2	Méthode.....	52
II.16.2.2	Réalisation de la transcription inverse.....	53
II.16.2.2.1	Matériel.....	53
II.16.2.2.2	Méthode.....	54
II.16.2.3	Recherche de couples d'amorces appropriées.....	55
II.16.2.4	Détermination de la concentration en amorces.....	55
II.16.2.5	Détermination de la courbe de dilution de l'ADN.....	55
II.16.2.6	Quantification de l'expression des gènes.....	55
II.16.2.7	Cycles Real Time PCR.....	56
II.16.2.8	Analyse des résultats.....	56
II.17	Purification d'ADN.....	56

II.17.1	A partir de gel d'agarose.....	56
II.17.1.1	Matériel.....	57
II.17.1.2	Méthode.....	57
III	RESULTATS.....	58
III.1	Etude de biomarqueurs de la sénescence après des stress subcytotoxiques et répétés aux U.V.B.....	58
III.1.1	Activité SA- β gal (Senescence Associated β -galactosidase).....	59
III.1.2	Incorporation de [3H]-thymidine.....	59
III.1.3	Etude du niveau relatif de transcrits de gènes associés à la sénescence par Real Time PCR	59
III.1.4	Etude du niveau protéique de l'apo J lors de la SIPS induite par les U.V.B.....	61
III.2	Rôle de la surexpression de l'apo J humaine en SIPS induite par U.V.B.....	62
III.2.1	Clonage de l'apo J humaine dans le vecteur pLXSN	62
III.2.2	Clonage de l'apo J humaine dans le vecteur pCDNA3.1.A His/V5	63
III.2.2.1	Clonage dans le vecteur pCDNA3.1.A His/V5.....	63
III.2.2.2	Transfection transitoire dans les cellules COS.....	64
III.2.2.3	Transfection stable dans les fibroblastes immortalisés de souche SV -40.....	65
III.2.2.3.1	Western blot.....	65
III.2.2.3.2	Stress cytotoxiques.....	66
III.2.3	Clonage de l'apo J humaine avec « tag » dans le vecteur pLXSN	67
IV	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	68
V	BIBLIOGRAPHIE.....	73

Introduction

I INTRODUCTION

I.1 Sénescence répllicative et SIPS

I.1.1 La sénescence répllicative

Depuis 1910, des études ont été menées sur le comportement des cellules en culture *in vitro* extraites de différentes biopsies. En 1912, Carrel mit en culture des cellules de muscle cardiaque de poulet qui proliférèrent pendant environ trente ans. On pensa donc que les cellules étaient immortelles. Or, ce phénomène était probablement dû à un artéfact expérimental. En effet, en opérant les changements de milieu des cellules, de nouvelles cellules étaient apportées à la culture (Hayflick, 1977). En 1916, Peyton Rous a réalisé des cultures de cellules en mono-couche sur support et a utilisé de la trypsine pour les détacher et pouvoir ainsi les récupérer. Vers 1960, plusieurs chercheurs (tels Dulbecco, Eagle, Bayreuther, Hayflick,...) mirent au point des milieux de culture artificiels contenant entre autre du glucose, des vitamines, des acides aminés, des sels divers et standardisèrent la préparation de sérum. A partir de cette époque, les cultures se réalisèrent stérilement.

En 1961, Hayflick et Moorhead ont suivi l'évolution des capacités prolifératives des fibroblastes humains normaux en culture au cours du temps, et plus exactement au cours des passages sériés en culture (Hayflick *et al.*, 1961). Ils ont montré que ces cellules ne se divisent qu'un nombre limité de fois en culture. Par exemple, un fibroblaste de peau ou de poumon perd sa capacité de réplication après environ 50 passages en culture. Ce phénomène est connu sous le nom de « sénescence répllicative ».

Une courbe, dite courbe de Hayflick, reprend l'évolution du nombre de cellules depuis la mise en culture d'un explant de tissu (biopsie) jusqu'à la sénescence répllicative, puis la mort cellulaire (**Figure I-1**).

Trois phases principales caractérisent cette courbe:

- la phase I correspond à la mise en culture des cellules provenant de la biopsie,

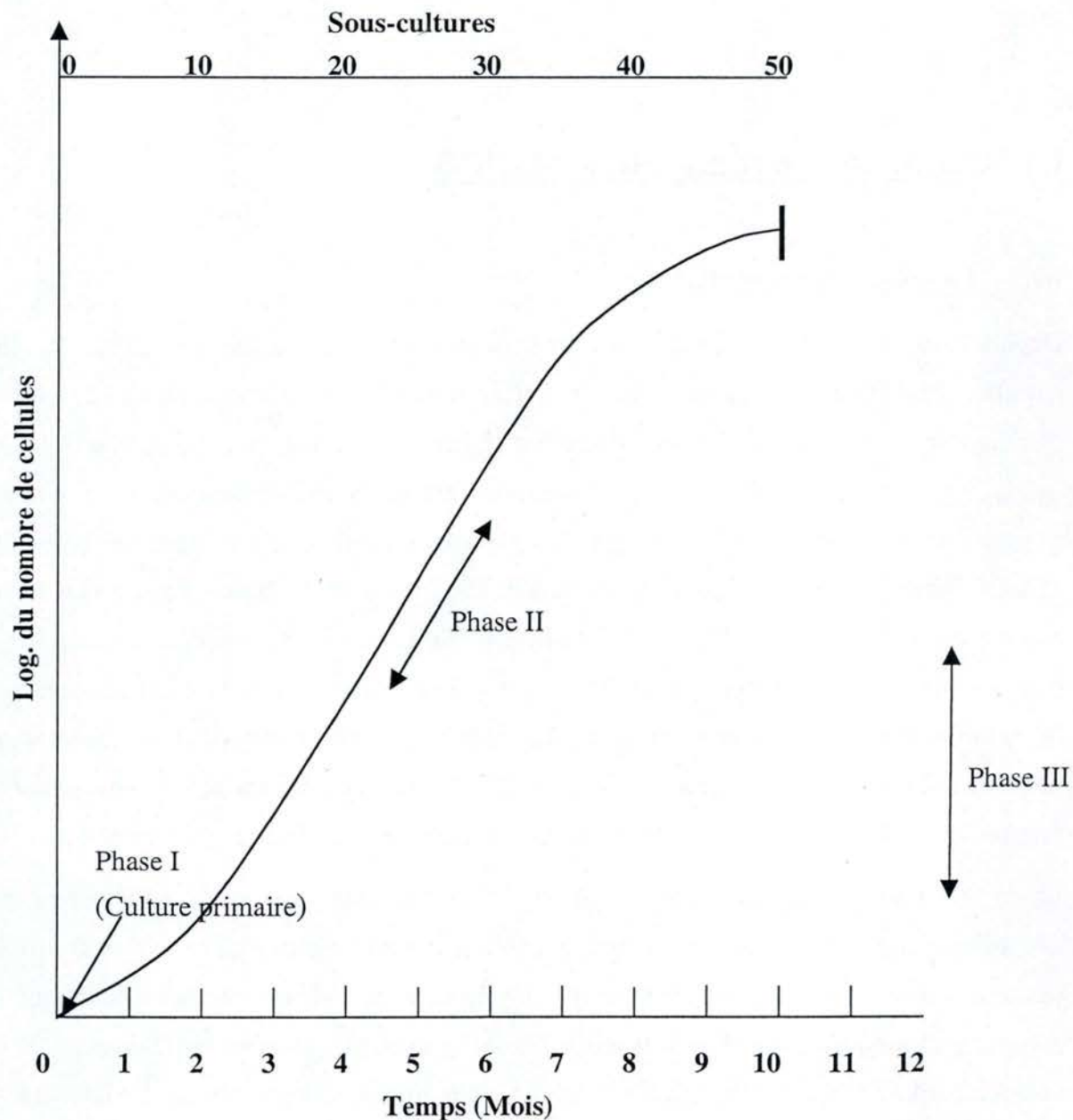


Figure I-1 : Illustration du phénomène de sénescence répliquative des cellules en culture (Hayflick, 1977). Succession des phases de mise en culture primaire (Phase I), de prolifération (Phase II), et de dégénérescence précédant la mort des cellules (Phase III).

- la phase II, ou phase exponentielle, est caractérisée par une croissance rapide et exponentielle des cellules, c'est-à-dire qu'une cellule mère donne rapidement lieu à 2 cellules filles et ainsi de suite,
- la phase III montre un ralentissement lent et progressif de la croissance de la culture suivi par le blocage du cycle cellulaire.

La sénescence répliquative est définie par l'arrêt des divisions cellulaires (Campisi *et al.*, 1996). On peut donc maintenir les cellules en culture pendant plusieurs mois, en fonction du type cellulaire, avant d'assister à leur mort progressive.

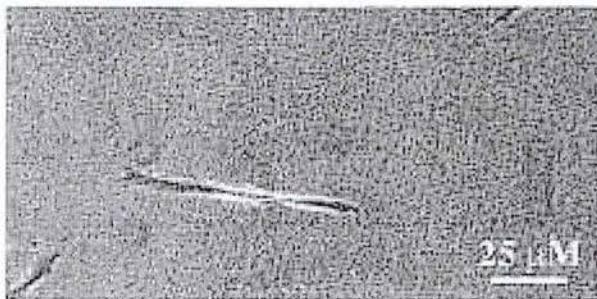
1.1.2 La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

Plusieurs modèles expérimentaux font intervenir des stress qui vont induire prématurément un état cellulaire sénescence. On parle dans ce cas de Sénescence Induite Prématurément par les Stress ou SIPS. Un stress cellulaire est constitué d'une perturbation néfaste de l'environnement des cellules. Au cours de leur vie, les cellules sont soumises à une multitude de stress relativement divers auxquels elles doivent faire face en activant ou en inhibant certaines voies métaboliques.

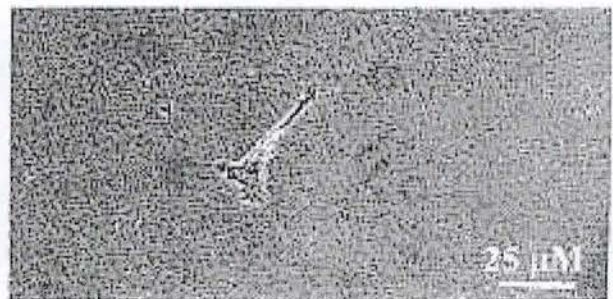
On peut classer les stress en 3 grandes catégories selon un cadre théorique bien établi (Remacle *et al.*, 1980; Toussaint *et al.*, 1995).

- La première représente les stress de faible intensité qui sont omniprésents. Ces stress stimulent sans cesse les systèmes de défense et de réparation de la cellule sans créer de dommages irréversibles. Ces stress regroupent les fluctuations faibles de température, de pH, de courants ioniques, etc.
- La seconde regroupe les stress sont des stress d'intensité intermédiaire. Ces stress peuvent être répétés. Ici, on observe une création de dommages irréversibles car les systèmes de réparation de la cellule ne sont plus aptes à faire face à ce genre d'agression trop intense. Ces stress sont dus à de fortes fluctuations de l'environnement de la cellule, comme un excès de radicaux libres ou une exposition répétée aux ultraviolets (U.V.). Chez divers types cellulaires, ces conditions entraînent la SIPS.
- La troisième correspond aux stress de forte intensité. Ceux-ci sont tellement importants que la cellule ne peut plus les contrer, ses systèmes de réparation sont dépassés. Ces stress entraînent la mort cellulaire.

MF I



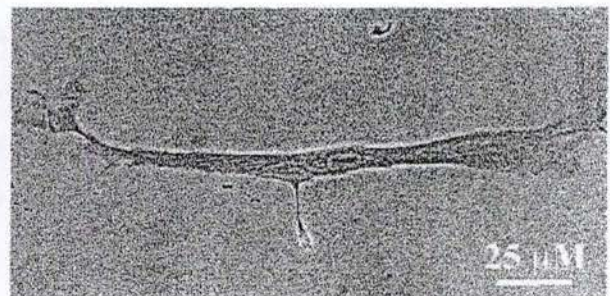
MF II



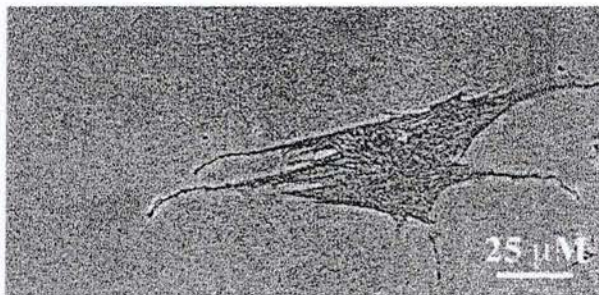
MF III



PMF IV



PMF V



PMF VI

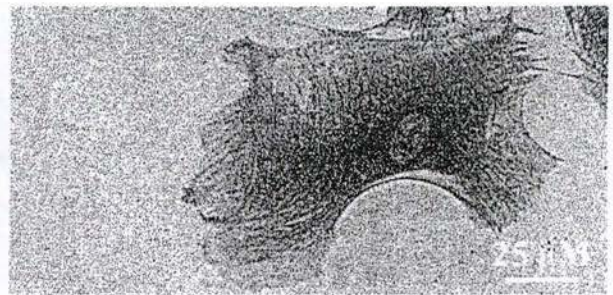


Figure I-2 : Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des fibroblastes humains de poumons foetal de souche WI-38. (1) fibroblaste mitotique MF I, (2) fibroblaste mitotique MF II, (3) fibroblaste mitotique MF III, (4) fibroblaste post-mitotique MF IV, (5) fibroblaste post-mitotique MF V, (6) fibroblaste post-mitotique MF VI. Le PMF VII, fibroblaste dégénératif, n'est pas représenté compte tenu de sa rareté dans une population de fibroblastes humains diploïdes (Toussaint *et al.*, 1992).

Les stress, quelle que soit leur intensité, peuvent être de différentes natures, comme par exemple :

- les stress oxydatifs générés par une exposition à des dérivés réactionnels de l'oxygène,
- les stress aux U.V. (étudiés dans le cadre de ce travail),
- les stress chimiques (changement de pH, présence d'éthanol, présence de métaux lourds, etc),
- les stress thermiques et mécaniques,
- etc.

Au laboratoire, on s'est principalement focalisé sur l'étude des effets des stress répétés subcytotoxiques sur des fibroblastes humains. Ainsi, les fibroblastes exposés à des doses subcytotoxiques de *tert*-Butyl HydroPéroxyde (t-BHP) et H₂O₂ qui génèrent des radicaux libres, d'éthanol, qui fluidifie les membranes et modifie ainsi plusieurs paramètres biologiques comme les flux ioniques, ou d'ultraviolets de type B ; développent prématurément les biomarqueurs de la sénescence répllicative.

I.2 Les biomarqueurs de la sénescence

I.2.1 Les morphotypes

L'équipe de Bayreuther (Bayreuther *et al.*, 1988a; Bayreuther *et al.*, 1988b) a montré que les fibroblastes peuvent être classés selon leur morphologie. Le vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains diploïdes (FHDs : Fibroblastes Humains Diploïdes) est caractérisé par de profonds changements morphologiques. A confluence, la densité cellulaire est moindre dans une culture sénescence que dans une culture jeune, non seulement parce que la taille des cellules est plus importante mais également parce que les FHDs sénescents sont plus sensibles aux mécanismes d'inhibition de contact. Les cultures sénescences sont beaucoup plus désordonnées, l'arrangement des fibroblastes en faisceau est beaucoup moins régulier.

Sept classes distinctes de morphotypes, basées sur la forme, la taille et le rapport de surface noyau/cytoplasme, ont été ainsi mises en évidence au cours des passages en culture des fibroblastes.

On peut classer les morphotypes en 3 grandes catégories (**Figure I-2**).

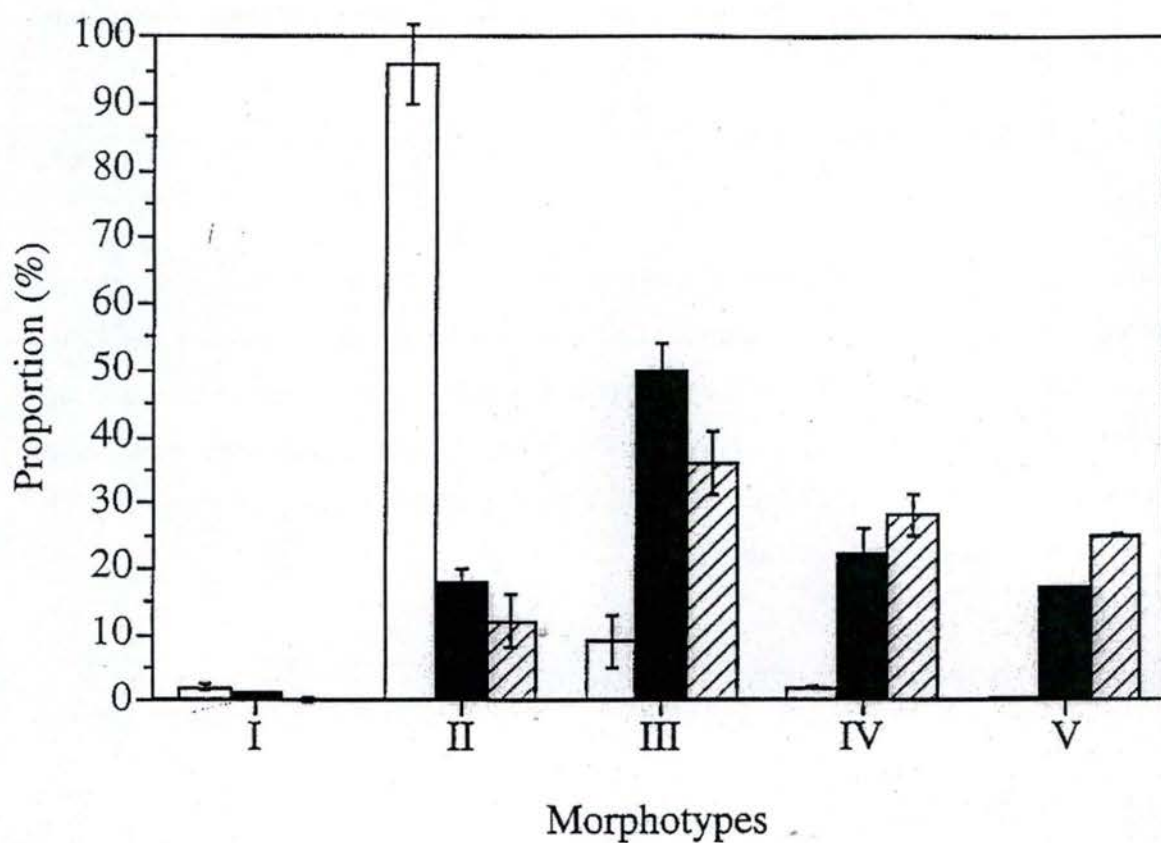
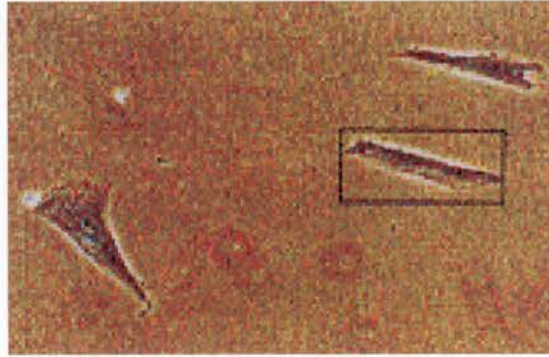
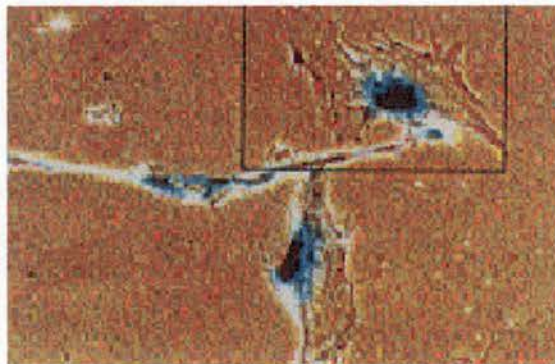


Figure I-3 : Proportion des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes (passage en culture 27) (colonnes blanches), âgés (passage en culture 43) (colonnes noires), et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi cinq stress successifs de 1 heure en présence de *tert*-butylhydroperoxyde 100 μ M (colonnes hachurées) (Toussaint *et al.*, 1998).



Fibroblastes jeunes : morphologie de cellules jeunes où aucune activité β -galactosidase associée à la sénescence n'est détectable.



Fibroblastes sénescents : morphologie de cellules sénescents et présence d'une activité β -galactosidase associée à la sénescence.

Figure I-4 : Photographie de fibroblastes WI-38 ayant subi un traitement histochimique pour la mise en évidence de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (Toussaint *et al.*, 2000).

- Les morphotypes mitotiques (I, II, III) ; ces fibroblastes, petits et de forme élancée, sont capables de se diviser activement. Ils sont fortement représentés dans les cultures issues de biopsies provenant d'individus jeunes.
- Les morphotypes post-mitotiques (IV, V, VI) ; ces fibroblastes sont beaucoup plus présents dans les cultures ayant effectué un grand nombre de passages en culture. Leur morphologie est beaucoup plus étalée, leur métabolisme est nettement moins actif.
- Le morphotype nécrotique (VII) ou dégénérescent est celui qui est observé quelques heures avant la mort de la cellule. Il est rarement détectable.

La proportion des différents morphotypes d'une population dépend directement de l'âge de la culture qui lui, est exprimé en « nombre de doublements cumulés de population » : DCPs. La transition entre morphotypes s'opère de façon continue. L'estimation par comptage de leurs différentes proportions dans une population, peut donner une idée de l'âge de la culture. Une population jeune est essentiellement composée de cellules de morphotypes I, II et III, car les cellules se divisent activement. Par contre, une population ayant dépassé les 35-40 passages en culture sera essentiellement composée de cellules de morphotypes IV, V, VI et de quelques morphotypes III qui continuent de se diviser (**Figure I-3**). Les stress sont capables d'opérer de façon accélérée une transition d'un morphotype vers un autre, ceci a été démontré notamment après les stress au t-BHP (Toussaint *et al.*, 1998).

1.2.2 L'activité β -galactosidase associée à la sénescence

L'équipe de Campisi (Dimri *et al.*, 1995) a mis en évidence chez les cellules sénescents une activité enzymatique β -galactosidase spécifique appelée « Senescence-Associated β -galactosidase Activity » (S-A β -gal) (**Figure I-4**). Cette activité est détectable à pH 6,0 chez les cellules sénescents (elle se différencie ainsi de l'activité β -galactosidase détectable également chez les cellules jeunes à pH 4,0). On explique l'apparition de cette activité enzymatique par le fait que les lysosomes augmentent fortement de taille (Remacle *et al.*, 1980) chez les cellules sénescents ce qui fait que si on se situe à pH 6,0 l'activité S-A β -gal est détectable uniquement chez les cellules âgées (Kurz *et al.*, 2000). On assiste à ce niveau à un élargissement du pH optimal du seuil de détection de l'activité. Cette activité est révélée en présence d'un substrat chromogénique de la β -galactosidase, le x-gal, qui provoque la coloration des cellules sénescents en bleu à pH 6,0 après clivage par l'enzyme.

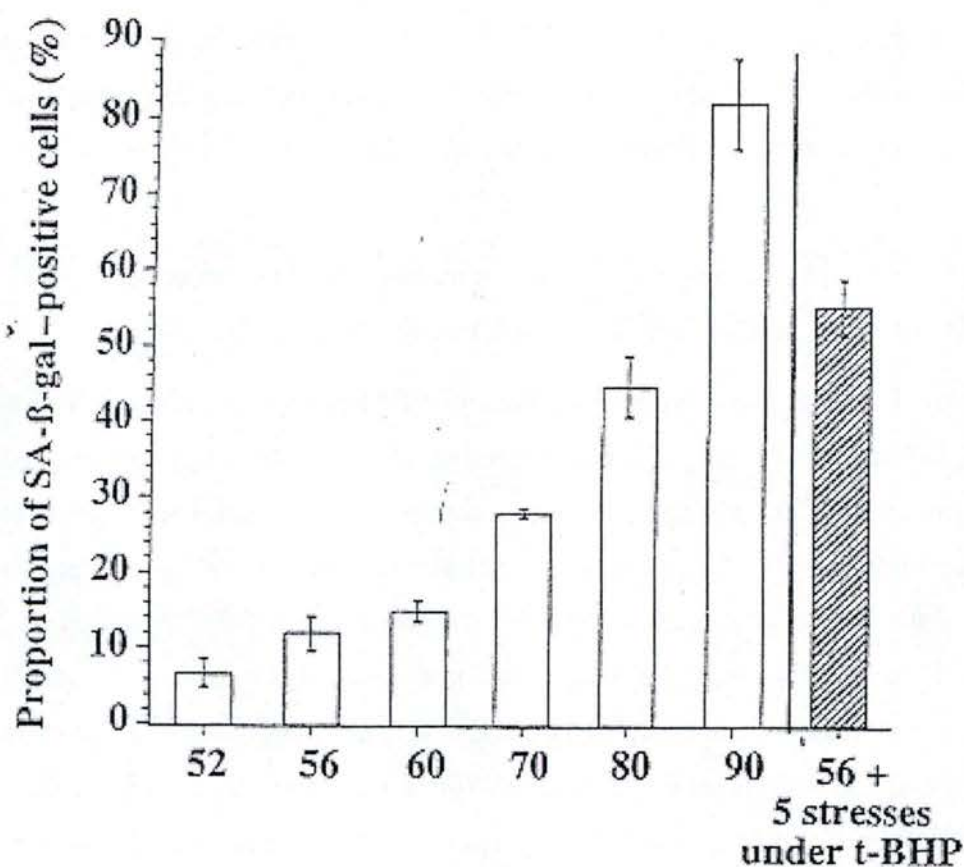


Figure I-5 : Effets de stress répétés au t-BHP sur la proportion de cellules positives pour l'activité SA β -galactosidase. Données pour des fibroblastes de 52 à 90 % de leur potentiel prolifératif (colonnes blanches) et fibroblastes à 56 % de leur potentiel prolifératif soumis à 5 stress d'une heure sous 30 μ M de t-BHP (colonnes hachurées). Les valeurs représentées sont les proportions moyennes \pm la déviation standard et ont été obtenues à partir de 4 expériences (Dumont *et al.*, 2000).

Ce biomarqueur de la sénescence répliquative existe chez plusieurs types cellulaires humains tels les fibroblastes, les kératinocytes, etc (Dimri *et al.*, 1995). L'équipe de Campisi a pu aussi observer que des cellules immortalisées avec l'antigène T du virus SV40 ne présentaient pas d'activité S-A β -gal, malgré les nombreux passages en culture réalisés. Si la sénescence est induite chez ces cellules, alors l'activité S-A β -gal se révèle positive (Dimri *et al.*, 1995).

Dans une culture de fibroblastes, au fur et à mesure que le nombre de passages en culture augmente, la proportion de cellules positives pour la S-A β -gal augmente aussi. De même lors de la SIPS : la proportion de cellules positives à la S-A β -gal est augmentée à partir de 48 heures après des stress subcytotoxiques sous t-BHP ou sous H_2O_2 (Dumont *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2001a) (**Figure I-5**).

I.2.3 L'altération du génome mitochondrial

Les mitochondries assurent la production d'énergie, l'ATP, au sein de la cellule. Elles disposent de leur propre génome codant pour une partie des protéines de la chaîne de transport d'électrons. Chez les cellules en sénescence répliquative, plusieurs délétions ou mutations sont observées (Lee *et al.*, 1997). Une de ces délétions est relativement commune chez les cellules sénescents, elle a une taille de 4,977 kb. Cette délétion en soi n'est pas dangereuse directement pour la cellule car celle-ci contient de nombreuses mitochondries. Par contre, si un nombre élevé des mitochondries de la cellule possèdent cette délétion, cette cellule se retrouve privée d'ATP, ce qui peut lui être fatal (Lee *et al.*, 1997; Ozawa *et al.*, 1991). Cette délétion se retrouve chez les mitochondries des fibroblastes WI-38 en sénescence répliquative, mais aussi chez ceux ayant subi des stress oxydatifs sous t-BHP qui conduisent à la SIPS (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure I-6**).

I.2.4 Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont constitués d'une longue série de répétitions successives de bases (TTAGGG chez l'homme) situées aux extrémités des chromosomes. Ces répétitions sont des séquences non codantes. A la naissance, chez les fibroblastes humains, ils ont une longueur d'environ 10 à 15 kb et leur taille diminue d'environ 50 à 150 paires de bases à chaque division cellulaire pour les cellules somatiques (**Figure I-7**). Les cellules deviendraient dès lors sénescents dès que les télomères auraient atteint une longueur critique (Allsopp, 1996; Harley *et al.*, 1990). Les télomères sont essentiels pour la stabilité chromosomique. Ils

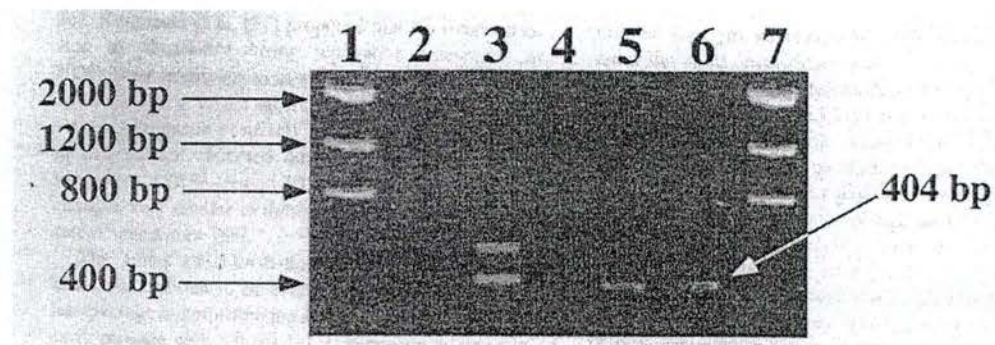
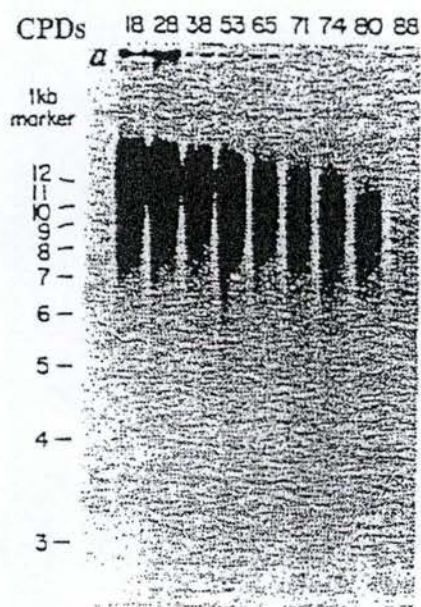
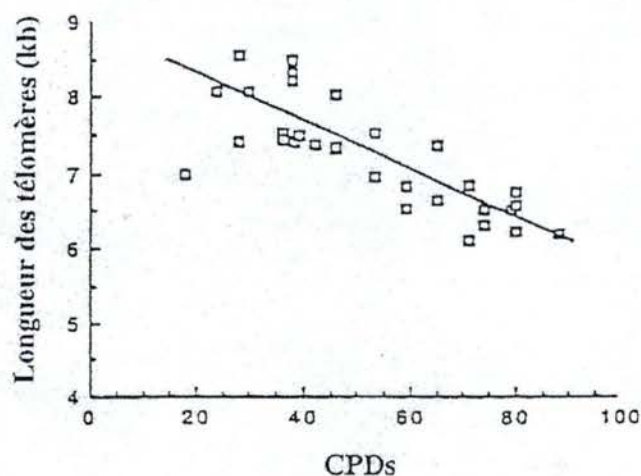


Figure I-6 : Détection de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp par « Nested PCR ». Puits 1 et 7 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 : extraits de fibroblastes WI-38 à 55 % de leur potentiel de prolifération. Puits 3 : extraits de fibroblastes WI-38 à 55 % de leur potentiel de prolifération et ayant subi 5 stress d'une heure sous 30 μ M de t-BHP. Puits 4 : contrôle négatif (PCR réalisée sans template). Puits 5 : extraits de fibroblastes WI-38 à 70 % de leur potentiel de prolifération. Puits 6 : extraits de fibroblastes WI-38 à 95 % de leur potentiel de prolifération. La présence de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp donne un produit de 404 bp, indiqué par la flèche. A noter une délétion supplémentaire après les stress sous t-BHP (puits 3) (Dumont *et al.*, 2000).



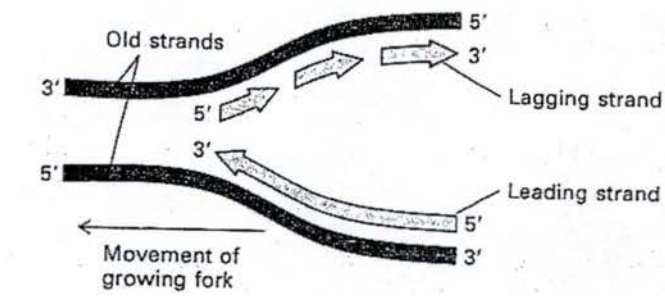
(A)



(B)

Figure I-7 : Raccourcissement des télomères au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains normaux (Harley *et al.*, 1990).

- (A) Autoradiographie de southern blot montrant le raccourcissement des télomères (fragment de restriction terminal (TRF) ; sonde TTAGGG) chez la souche de fibroblastes humains normaux HSC 172.
- (B) Quantification du raccourcissement des télomères en fonction du nombre de doublements de population effectués, pour la souche de fibroblastes humains HSC 172.



Lagging-strand synthesis

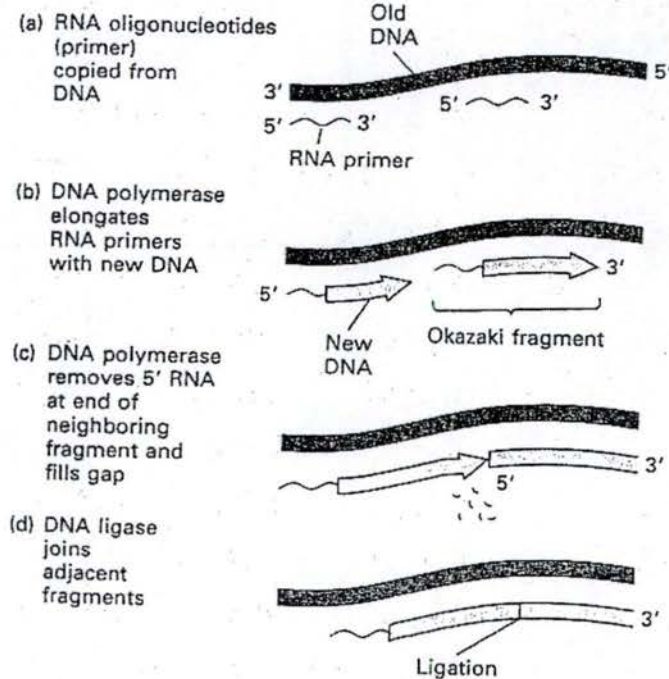


Figure I-8: Schéma de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase (Lodish, *et al.*, 1997)

empêchent la dégradation des extrémités des chromosomes ainsi que leur fusion (Pour une revue : (Dumont *et al.*, 2001b)).

Le raccourcissement des télomères est dû à l'ADN polymérase qui est incapable de répliquer l'entièreté du chromosome (**Figure I-8**). L'ADN polymérase ne peut synthétiser que dans le sens 5'-3' (pour une revue : (Shay *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2001)). Un des 2 brins est dès lors synthétisé sous forme de fragments d'Okazaki. Cette méthode de synthèse nécessite l'intervention d'amorces d'ARN dont une à l'extrémité d'un nouveau brin. Cette amorce sera par la suite dégradée et remplacée par de l'ADN pour former un brin continu, mais ce remplacement sera impossible pour la première amorce à l'extrémité du brin. Il restera donc une extrémité protrudante sur le brin anti-complémentaire. Ce processus n'a, par contre, pas lieu chez les cellules germinales ni chez les cellules tumorales. En effet, ces cellules expriment une enzyme qui empêche le raccourcissement des télomères: la télomérase. Celle-ci est capable de maintenir la longueur des télomères constante en synthétisant à chaque division, sur base de la matrice d'ARN, le fragment de télomère qui serait perdu (Bodnar *et al.*, 1998; Greider *et al.*, 1996).

Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que le raccourcissement des télomères pourrait être à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire. La cellule pourrait percevoir ce raccourcissement comme un dommage à l'ADN, ce qui entraînerait l'activation de p53, qui lui-même activerait p21^{Waf-1}, ce qui mènerait à l'arrêt du cycle.

Les cellules en SIPS déclenchée par le t-BHP ou l'H₂O₂ montrent aussi un raccourcissement accéléré des télomères (Dumont *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2001a).

1.2.5 Régulation et arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en 4 grandes phases : G1, S, G2, M. Ce sont les kinases dépendantes de cyclines associées à des cyclines spécifiques qui vont venir réguler ces différentes phases du cycle cellulaire. L'expression des cyclines est régulée de manière complexe durant les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cellules sénescents ne sont plus capables de se diviser. Ce blocage survient à la fin de la phase G1 où se situe le point de restriction G0. Si ce point est dépassé, le cycle sera achevé jusqu'au bout, les cellules ne répondent plus aux inhibiteurs du cycle cellulaire. Une fois la cellule déclarée sénescents, son cycle s'achève en phase G1, elle ne passe plus le point de restriction. Différents mécanismes régulent ce passage (**Figure I-9**) (**Tableau I-1**).

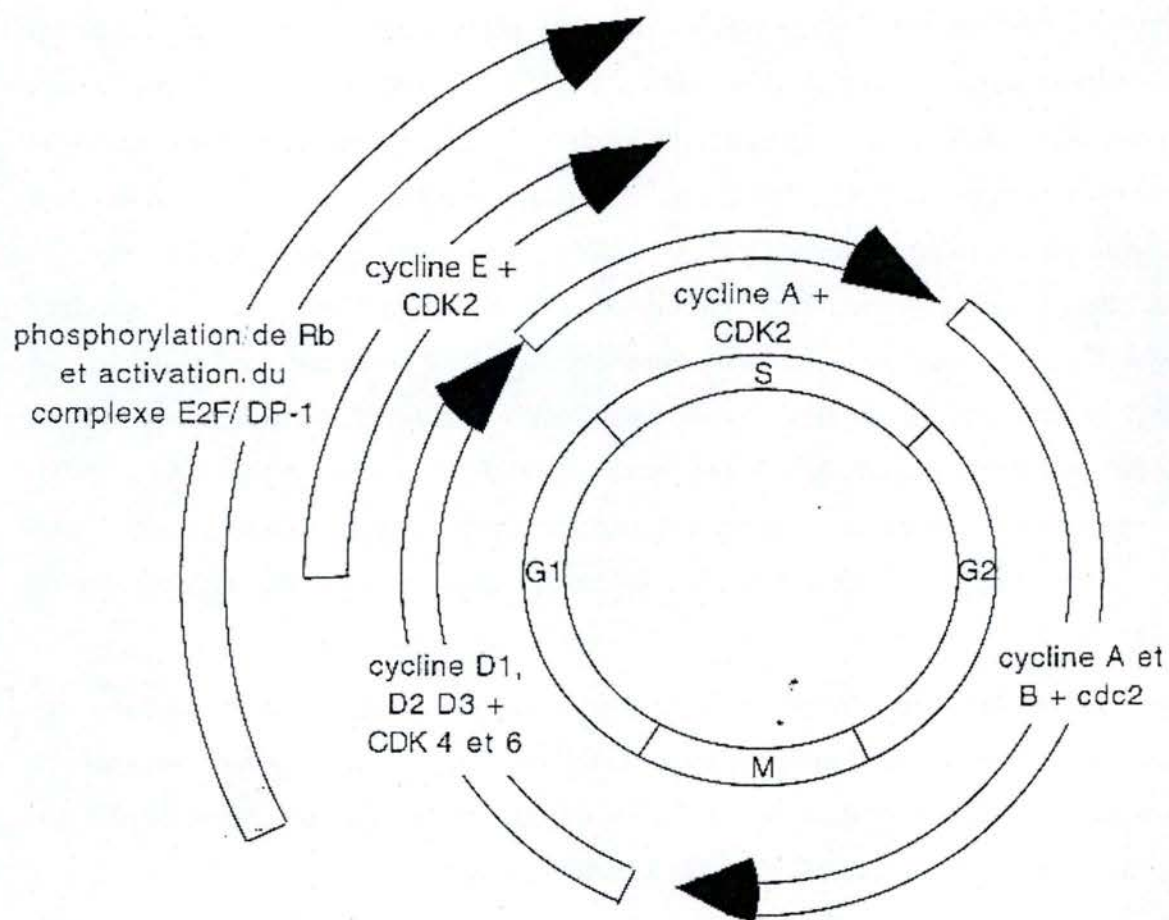


Figure I-9 : Représentation simplifiée de l'implication temporelle des différents complexes cycline-CDK (Ravitz *et al.*, 1997)

Protéine du cycle cellulaire	Implication dans le cycle cellulaire	Fonction	Régulation de l'activité
cycline A	S, progression dans M	active CDK2 active CDC2	transcriptionnelle et dégradation ubiquitine dépendante
cycline B1	progression dans M	active CDC2	transcription elle et dégradation ubiquitine dépendante
cycline B2	progression dans M	?	dégradation ubiquitine dépendante
cycline C	progression à travers G1?	active CDK8	?
cycline D1, D2, D3	progression à travers G1	active CDK4 et 6	transcriptionnelle et dégradation régulée par les séquence PEST
cycline E	progression dans G2 et M	active CDK2	transcriptionnelle et dégradation régulée par les séquence PEST
cycline F	progression dans M	lie Skp1, impliquée dans la protéolyse	transcriptionnelle
cycline G	?	réponse à p53 lors de dommage à l'ADN	transcriptionnelle
cycline H	progression dans toutes les phases	active CDK7	?
cycline I	principalement en G0	préserve l'arrêt en phase G0 lors de la différenciation terminale	?
cycline J	?	embryogenèse chez la Drosophile	transcriptionnelle
CDC2	progression dans M	phosphoryle les histone H1, la lamimine, ...	activée par les cyclines A et B
CDK2	progression dans S et après le signal START	s'associe et phosphoryle la machinerie de réplication de l'ADN, phosphoryle Rb	activée par les cyclines A et B
CDK3	progression dans G1 et après le signal START	?	?
CDK4	progression dans G1	phosphoryle Rb	activée par les cyclines D1, D2 et D3
CDK5	en G0?	phosphoryle les protéines des neurofilaments	activée par p35
CDK6	progression dans G1	phosphoryle Rb	activée par les cyclines D1, D2 et D3
CDK7	ubiquiste	active les CDK et phosphoryle la RNA polymérase II	activité dépendante de la présence de substrat?
CDK8	ubiquiste	phosphoryle la RNA polymérase II	liaison à la cycline C
p21 ^{Waf-1}	G1 et S	inhibe CDK2,4 et 6, le PCNA	transcriptionnelle par p53
p16 ^{Ink4a}	G1	inhibe CDK4 et 6 par déplacement de la cycline D	transcriptionnelle par Rb
p27 ^{Kip-1}	G1	inhibe CDK2 via le TGF-β ou le contact cellule cellule	relocalisation subcellulaire
p15 ^{Ink4b}	G1	inhibe CDK 4 et 6 par traitement au TGF-β	transcriptionnelle lors d'exposition au TGF-β
p18 ^{Ink4c}		inhibe CDK 4 et 6	?
p19 ^{Ink4d}	G1	inhibe CDK 4 et 6	?

Tableau I-1 : Représentation des principales protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Vogt *et al.*, 1998)

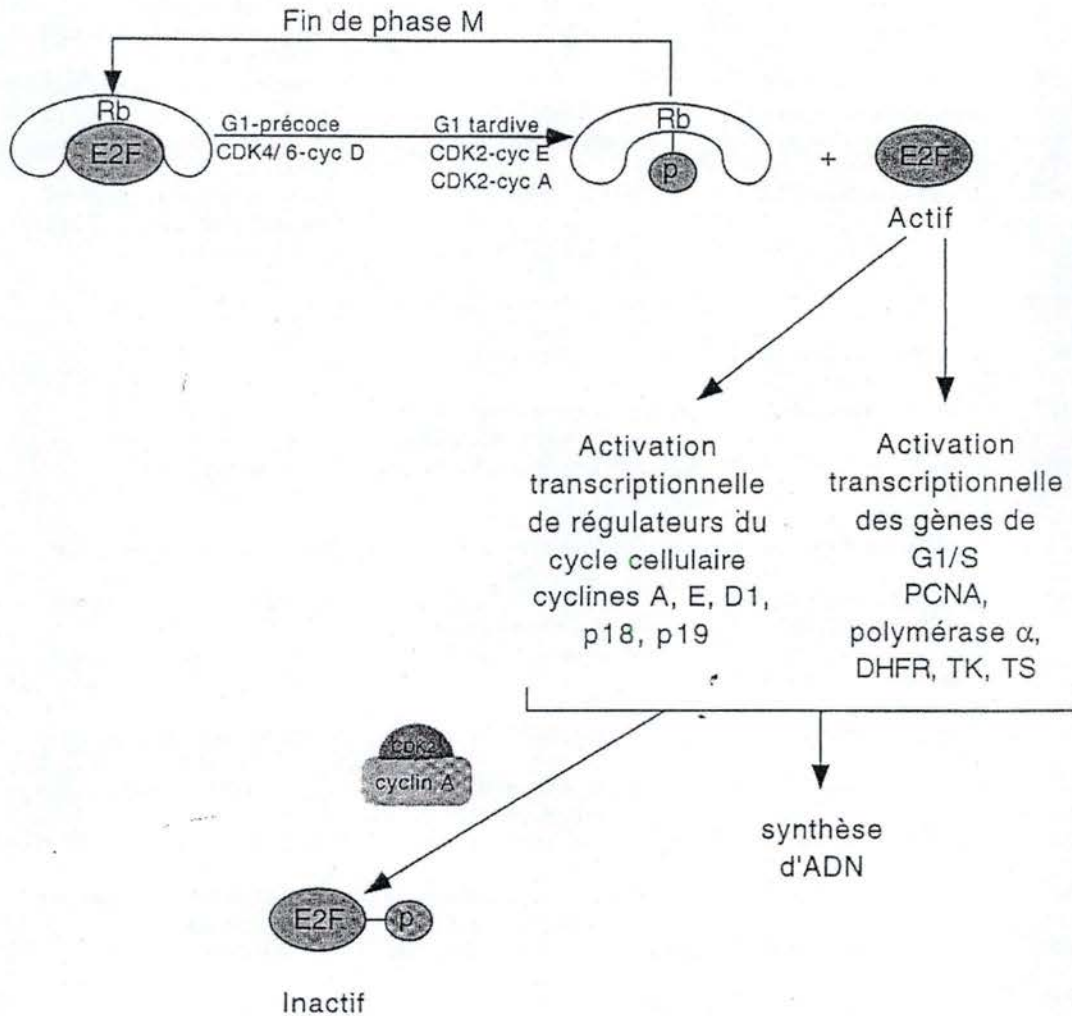


Figure I-10: Sous sa forme hypophosphorylée, pRB forme un complexe inactif avec le facteur de transcription E₂F. Dans la phase G1, pRB est hyperphosphorylée par des complexes cycline/CDKs, ce qui libère E₂F et rend possible l'entrée en phase S (Lodish *et al.*, 1995).

1.2.5.1 Répression de certains gènes de réponse précoce aux mitogènes

L'expression de ces gènes est induite rapidement après une stimulation des cellules par des facteurs de croissance. Leur expression paraît essentielle pour l'induction de la synthèse d'ADN. Parmi eux, on retrouve le gène *c-fos*. Celui-ci est un gène qui code pour une sous-unité du facteur de transcription AP-1 induisant la transcription des cyclines, kinases dépendantes de cyclines (CDKs) et du facteur E₂F. Ceux-ci sont induits immédiatement par *c-fos* après stimulation d'une cellule par des mitogènes. Chez les cellules sénescents, l'induction de *c-fos* est fortement diminuée. Le promoteur de *c-fos* contient une séquence cible : SRE (serum responsive element) qui sera reconnue par SRF (serum responsive factor), ce qui induit la transcription de *c-fos*. Chez les cellules âgées, SRF est hyperphosphorylée, ce qui empêche la liaison SRF-SRE et *c-fos* n'est donc plus transcrit (Atadja *et al.*, 1994). Toutefois cette répression n'est pas totale, on assiste plutôt à une baisse importante du niveau d'expression de *c-fos*.

C-fos faisant partie des gènes nécessaires au passage en phase S, cela donne une première explication quant au blocage du cycle cellulaire chez les cellules sénescents.

1.2.5.2 Répression des gènes de la phase G1/S

Plusieurs gènes, dont l'expression est normalement induite en fin de phase G1 ou en transition G1/S, ne sont plus exprimés dans les cellules sénescents (Pang *et al.*, 1994). Les gènes codant pour les enzymes nécessaires au métabolisme de l'ADN, tels que la thymidine kinase, la thymidilate synthétase, l'ADN polymérase α et la dihydrofolate réductase, montrent une expression fortement diminuée chez les cellules sénescents. Le mécanisme responsable de la répression de la plupart de ces gènes est causé chez les cellules sénescents par une déficience de l'activité du facteur de transcription E₂F (Good *et al.*, 1996). Les cellules sénescents sont déficientes en E₂F₁, une des sous-unités du facteur de transcription E₂F indispensable pour la réalisation de la transition G1/S du cycle cellulaire (Dimri *et al.*, 1996; Farnham *et al.*, 1993). En temps normal E₂F est inactif, il est lié à pRB. Lorsque pRB est phosphorylé par les complexes cyclines-CDKs, il libère E₂F qui devient actif. En temps que facteur de transcription, il va activer la transcription des gènes nécessaires au passage en phase S, tels la dihydrofolate réductase et la thymidine kinase (**Figure I-10**).

1.2.5.3 Répression des cyclines et kinases dépendantes de cyclines

Les kinases dépendantes de cyclines sont nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Chaque CDK doit s'associer à une cycline particulière pour pouvoir être active et avoir ainsi une activité kinase. Les CDKs participent à l'activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression de multiples gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Au cours du temps, on observe une diminution du niveau d'expression de plusieurs cyclines et CDKs nécessaires au passage en G1 et en G2. Chez les fibroblastes âgés, la transcription de CDK2, et des cyclines A et B s'arrête (Stein *et al.*, 1991). Il y a aussi perte de l'activité enzymatique de complexes cycline-CDKs.

1.2.5.4 Expression d'inhibiteurs de complexes cyclines-CDKs (=CDKIs)

Parallèlement à la régulation de l'expression des cyclines CDKs, il existe des protéines qui peuvent se lier aux complexes CDKs-cyclines et qui inhibent l'activité de ces complexes. Ce sont les CDKIs (Gerland *et al.*, 2001). On retrouve parmi ces inhibiteurs deux grandes familles.

- La famille INK4 comprenant p16^{INK4A}, p15^{INK5B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}. La caractéristique de cette famille d'inhibiteurs est qu'ils lient tous les complexes protéiques contenant CDK4 et CDK6. Ce type de liaison des inhibiteurs, perturbant la liaison de ces kinases dépendantes de cyclines aux cyclines, a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation de pRB essentielle à la progression du cycle cellulaire.
- La famille de p21^{Waf-1}. Cette famille comprend aussi p27^{kip-1} et p57^{kip-2}. La transcription de p21^{Waf-1} est induite par p53. Chez les cellules jeunes, p53 est réprimé par MDM2, une protéine induite par les facteurs mitogènes. Par contre, chez les cellules sénescents, les facteurs mitogènes n'induisent plus MDM2; p53 est donc actif et déclenche ainsi la transcription de p21^{Waf-1} (Campisi, 1996; Noda *et al.*, 1994). C'est ainsi que pRB n'est plus phosphorylé et que le cycle cellulaire se retrouve bloqué (Stein *et al.*, 1990).

Une des conséquences majeures de l'inhibition des complexes cyclines-CDKs, visée par ces inhibiteurs, est la non phosphorylation de pRB.

1.2.6 La réplication de l'ADN

Suite à la sénescence, on a pu mettre en évidence une diminution suivie d'un arrêt de la réplication de l'ADN, dû à un blocage irréversible du cycle cellulaire. Un marquage à la thymidine tritiée a permis de mettre en évidence cet arrêt de la réplication de l'ADN. La proportion de fibroblastes sénescents n'incorporant plus la thymidine tritiée augmente au fur et à mesure des doublements de populations. Dans les cultures jeunes, 80 à 90 % des cellules sont marquées par opposition aux cultures sénescents où cette proportion diminue fortement en fonction de l'âge de la culture. De même, chez les cellules en SIPS déclenchée par des stress successifs au t-BHP, l'incorporation de thymidine tritiée diminue fortement, devenant similaire à celle observée chez les cellules sénescents (Dumont *et al.*, 2000).

1.2.7 Modulation de l'expression génique

Le niveau d'expression de plus de 80 gènes varie chez les cellules en sénescence répliative. Ces gènes codent pour des facteurs ou inhibiteurs de croissance, des récepteurs, des cytokines, des composants de la matrice extracellulaire, des protéines et enzymes de synthèse, de réparation et de structure de l'ADN ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire. La surexpression de certains de ces gènes est utilisée couramment comme biomarqueur de la sénescence répliative et de la SIPS (Dumont *et al.*, 2000). Ces gènes sont notamment : la fibronectine, SM22, l'ostéonectine, p21^{Waf-1}, p16^{INK-4a}, α 1-procollagène, l'apolipoprotéine J.

Nous décrirons plus longuement l'apolipoprotéine J dans un chapitre spécifique de l'introduction.

1.3 Dommages entraînés par les radiations ultra-violettes au niveau de l'ADN

Le type de stress employé lors de ce travail consiste à l'exposition des cellules à des radiations de type ultraviolet.

La lumière solaire est composée de radiations électromagnétiques de différentes longueurs d'ondes :

- les ultraviolets (U.V.), dont la longueur d'onde varie de 190 nm à 400 nm,
- la lumière visible, dont la longueur d'onde se situe entre 400 nm et 800 nm,

- les infra-rouges, dont la longueur d'onde est supérieure à 800 nm.

Les ultraviolets peuvent être séparés en trois grandes classes :

- les U.V.A, dont la longueur d'onde varie entre 320 nm et 400 nm
- les U.V.B, dont la longueur d'onde varie entre 290 nm et 320 nm,
- les U.V.C, dont la longueur d'onde varie entre 190 nm et 290 nm.

La toxicité des ultraviolets est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Les U.V.C sont théoriquement les plus toxiques, mais la majeure partie est arrêtée au niveau de la couche d'ozone. Les U.V.B sont donc considérés comme les plus nocifs. Ils causent des dommages au niveau de l'ADN ce qui peut induire, entre autre, des modifications de l'expression génique (Sesto *et al.*, 2002).

Quand une molécule organique absorbe de la lumière visible ou une radiation U.V., elle passe dans un état excité, c'est-à-dire qu'un de ses électrons est transféré dans une orbitale atomique d'énergie supérieure. Cette molécule excitée peut réagir avec une grande variété de substrats, ce qui peut affecter directement ou indirectement l'ADN en y créant diverses modifications. Les molécules absorbantes excitées peuvent être comparées à des espèces génotoxiques similaires aux radicaux libres ou encore aux espèces réactives de l'oxygène. L'ensemble de ces molécules excitées constitue un risque élevé de cytotoxicité et de mutation.

Les dommages entraînés au niveau de l'ADN peuvent être classés en deux grandes catégories :

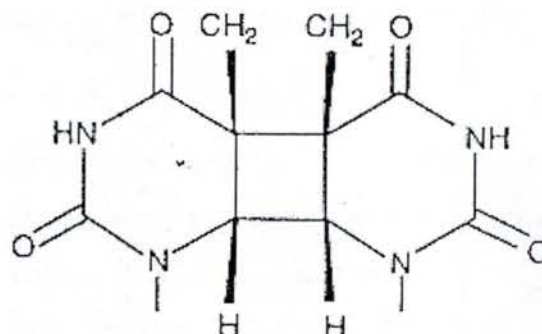
- les dommages directs où la radiation elle-même entraîne les dommages (Epe, 1985)(réactions de type I),
- les dommages indirects qui sont causés par la formation intermédiaire de composés chimiques réactionnels (Epe, 1985) (réactions de type II).

1.3.1 Dommages directs entraînés au niveau de l'ADN par des radiations U.V.

Le transfert d'énergie d'un substrat excité ou de la radiation U.V. elle-même, ne peut se faire vers l'ADN que si l'énergie d'excitation est supérieure ou égale à l'énergie nécessaire pour exciter l'ADN.

On observe deux photoproduits principaux générés au niveau de l'ADN par les radiations U.V. de faible longueur d'onde. Ce sont des liens covalents entre des pyrimidines adjacentes qui vont former (Naegeli, 1997) (**Figure I-11**) :

Cyclobutane pyrimidine dimer
between adjacent thymines (in
the *cis-syn* conformation)



Pyrimidine (6-4) pyrimidone
photoproduct between
thymine and cytosine.

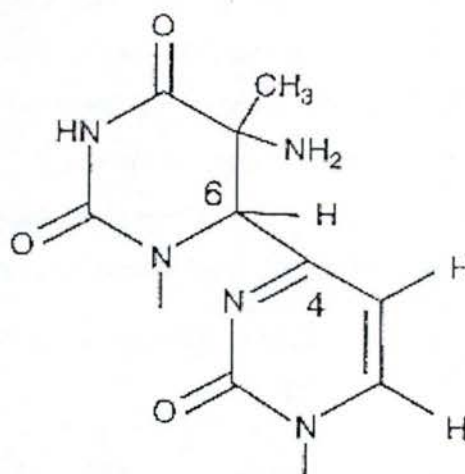


Figure I-11 : Produits formés au niveau de l'ADN suite à des radiations U.V.
(Naegeli, 1997).

- des dimères de pyrimidines cyclobutane entre deux thymine,
- un photoproduit de type pyrimidine (6-4) pyrimidone entre une thymine et une cytosine.

Ces deux produits sont des inhibiteurs de la réplication de l'ADN, ils sont cytotoxiques et entraînent des mutations au niveau de l'ADN. Les mutations les plus fréquemment induites sont (Naegeli, 1997) :

- GC → TA,
- TA → GC,
- TT → CC est une transition qui peut aussi bien être réalisée par les radiations U.V. que par les espèces réactives de l'oxygène et certaines espèces chimiques.

Les cellules de mammifère possèdent toutefois des complexes de réparation travaillant par excision-réparation pour contrer les dommages entraînés par les radiations U.V. (Mu *et al.*, 1995; Naegeli, 1997; Sancar, 1995).

1.3.2 Dommages indirects entraînés au niveau de l'ADN par des radiations U.V.

Les photons avec une longueur d'onde située principalement dans la gamme des U.V.A causent des dommages à travers l'action des espèces chimiques qu'ils génèrent. Autrement dit, ils n'agissent pas directement au niveau de l'ADN mais induisent la formation de composés réactifs qui, eux, vont entraîner des dommages au niveau de l'ADN.

L'oxygène moléculaire est la cause la plus importante des lésions au niveau de l'ADN dans les réactions de type II (Tyrrell, 1995). Le transfert d'énergie depuis les radiations jusqu'à l'oxygène génère de l'oxygène singulet ainsi que des anions superoxydes. L'oxygène singulet possède une réactivité suffisante pour modifier directement l'ADN, les protéines et les lipides. Par contre, l'anion superoxyde ne peut pas modifier l'ADN directement. Cependant, en présence de métaux de transition, il favorise la formation de radicaux hydroxyls qui sont extrêmement plus réactifs que l'oxygène singulet.

En plus de l'oxygène singulet, de l'anion superoxyde et des radicaux hydroxyls, les radiations U.V. peuvent aussi générer d'autres molécules réactives qui entraîneront des lésions. Ces molécules sont les radicaux thyls, peroxylys et alkyls qui peuvent créer des dommages au niveau de l'ADN et d'autres biomolécules.

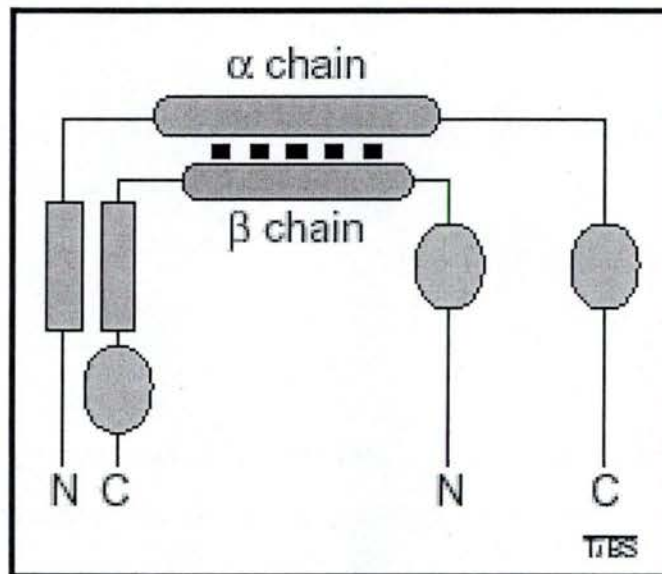


Figure I-12-a

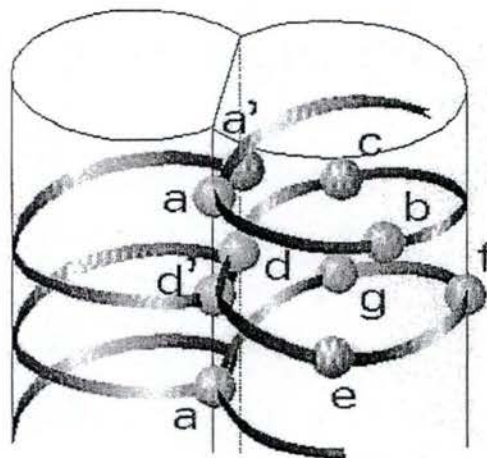


Figure I-12-b

Figure I-12 : Structure prédite de l'apolipoprotéine J (Figure I-12-a). Celle-ci est composée de 3 hélices α -amphipatiques (ronds), 2 hélices α -coiled-coil (rectangles), et une région composée de ponts disulfures servant à unir les 2 chaînes (ovales) (Wilson *et al.*, 2000). L'agencement coiled coil est un arrangement d'hélices α qui se présente comme cela (Figure I-12-b).

Un autre exemple de dommages indirects provient du fait que l'acide aminé tryptophane est capable, suite à l'absorption de radiations U.V., de générer des radicaux peroxy.

1.3.3 Conséquences biologiques des dommages induits par les radiations U.V.

Les conséquences des dommages au niveau de l'ADN à l'intérieur d'une cellule sont :

- l'induction d'une certaine cytotoxicité, ou le blocage de la réplication de l'ADN,
- l'apparition de mutations ou encore l'induction d'événements de recombinaison au sein du génome.

1.4 L'apolipoprotéine J (apo J)

L'apolipoprotéine J (apo J) est une glycoprotéine dimérique sécrétée. Son ADNc comporte 1350 paires de bases. L'ARN messenger de l'apo J est relativement ubiquitaire et sa séquence est fortement conservée au cours de l'évolution chez les différentes espèces. Cette conservation de séquence suggère un rôle biologique important. La masse moléculaire de la protéine varie entre 65 et 80 kDa suivant les modifications post-traductionnelles, par exemple les glycosylations, qui ont lieu dans le type cellulaire étudié. Les 2 chaînes qui la composent, α et β , sont reliées entre elles par un pont disulfure. L'ensemble de l'apo J est codé par un seul gène. Le produit précurseur de ce gène est scindé par clivage protéolytique en 2 chaînes α et β liées ensuite par des ponts disulfures avant d'être sécrétées par la cellule (Jenne *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 2000). Sa structure cristallographique n'est pas encore élucidée mais une hypothèse a été avancée. Cette structure contiendrait 3 grands types de domaines décrits à la **Figure I-12**. La protéine apo J comporte, du côté N-terminal, un peptide signal de 22 acides aminés suivi de la séquence d'une longueur de 449 acides aminés (Wilson *et al.*, 2000).

L'apo J est une glycoprotéine qui a été initialement isolée au niveau du système reproductif mâle (Bailey *et al.*, 1998). Par la suite, elle a été retrouvée dans plusieurs types de tissus et bien vite on s'est aperçu que son induction était liée à une condition stressante. On remarque une forte augmentation de son niveau d'expression dans des situations pathologiques comme la maladie d'Alzheimer (Lidstrom *et al.*, 1998), dans des situations de stress ou encore de chocs thermiques, etc.

Afin de déterminer les différentes fonctions biologiques de l'apo J, celle-ci a été comparée avec plusieurs structures homologues (Jenne *et al.*, 1992).

Il en est ressorti qu'elle pouvait :

- être considérée comme agent inhibiteur du complément et donc contrer la lyse cellulaire médiée par celui-ci,
- s'associer aux lipides tels les HDL (High Density Lipoproteins) et former avec eux de gros complexes,
- avoir un niveau d'expression fortement augmenté dans de nombreux tissus endommagés et ce afin de prendre part aux différents processus de remodelage et de réparation de ceux-ci ; elle régulerait aussi l'entrée en apoptose (Michel *et al.*, 1997),
- en étant surexprimée, conférer une protection contre diverses situations de stress comme des agents cytotoxiques tels les U.V.A, les chocs thermiques, les stress oxydatifs, etc (Petropoulou *et al.*, 2001; Schwochau *et al.*, 1998; Sensibar *et al.*, 1995) ; elle assurerait une fonction "chaperone-like" suite à un choc thermique, ou tout autre type de stress (conditions réductrices, etc.) altérant les protéines d'une cellule donnée (Humphreys *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 2002).

Cette dernière fonction serait sa fonction principale. Elle agirait donc de façon similaire aux sHSPs (small heat shock proteins). Suite à un choc thermique, l'ensemble des protéines d'une cellule se retrouve sous forme plus ou moins dépliée et non active. L'apo J se lierait aux régions hydrophobes apparentes et permettrait de replier les protéines afin de stabiliser leur conformation.

Au niveau du promoteur de l'apo J, une région de 14 pb, nommée CLE (« clusterin element »), est hautement conservée. Lors d'un choc thermique des « Heat Shock Elements » se lient sur CLE et induisent la transcription de l'apo J. Celle-ci peut ainsi exercer son rôle de chaperone, en empêchant la précipitation des protéines mal repliées (Michel *et al.*, 1997). Plusieurs expériences ont montré que l'apo J repliait les protéines mais ne leur rendait pas leur fonction initiale. En se fixant aux protéines mal repliées, l'ensemble forme un complexe de haut poids moléculaire (Humphreys *et al.*, 1999).

Différentes études ont montré que la quantité d'apo J augmentait fortement après différents stress, tels ceux à l'H₂O₂ et aux U.V.A (Viard *et al.*, 1999). Son action n'est donc pas limitée à contrer les chocs thermiques.

L'apo J a un rôle de protection contre les différents stress. Ceci n'a pas été étudié uniquement au niveau de la survie cellulaire. L'apo J protège aussi contre l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après des stress subcytotoxiques au t-BHP et à l'EtOH, après transfection stable de l'apo J dans des fibroblastes WI-38 (Dumont *et al.*, 2002).

Les résultats de protection de l'apo J se marquent au niveau de la proportion des morphotypes. La proportion de cellules positives pour la S-A β -gal décroît si les cellules stressées ont été préalablement transfectées avec l'apo J (Dumont *et al.*, 2002).

Lors de la sénescence répliative, on a mis en évidence une augmentation de la transcription de l'apo J. Toutefois, la surexpression de l'apo J seule n'induit pas la sénescence (Dumont *et al.*, 2002).

1.5 Transfection rétrovirale.

La transfection est un procédé qui permet d'introduire un fragment d'ADN_c contenant un gène d'intérêt, au sein d'une cellule eucaryote afin qu'il puisse s'y exprimer. Les méthodes pour y arriver sont multiples. La cellule est rendue transitoirement perméable à l'ADN_c soit par électroporation, par choc thermique, par traitement au CaCl₂, etc. L'ADN_c entre soit seul, mais le plus souvent il est accompagné d'un vecteur comme des lipides cationiques ou encore un virus inactivé. Ces vecteurs permettent de protéger l'ADN durant son parcours au sein de la cellule avant d'atteindre le noyau. Ce parcours n'est pas sans embûche : les enzymes dégradant l'ADN sont nombreuses. Toutes les cellules ne sont pas transfectables et la méthode optimale varie d'un type cellulaire à l'autre.

La transfection peut être stable, c'est-à-dire que l'ADN exogène s'intègre au sein du chromosome de la cellule hôte. Elle peut aussi être transitoire; et dans ce cas l'ADN exogène reste sous forme de plasmide et lors des divisions cellulaires seulement une des 2 cellules filles en héritera.

La transfection est principalement utilisée dans le but de corriger une fonction altérée en apportant le gène déficient, conférer une nouvelle fonction à la cellule ou encore y surexprimer une protéine déjà présente.

Dans le cadre de ce travail, nous avons besoin d'une méthode permettant une intégration stable de l'ADN_c de l'apo J. Si une transfection transitoire est utilisée, il est possible que l'ADN_c exogène soit perdu au cours des divisions vu que celui-ci pourrait ne pas s'intégrer au

Production, par des cellules PT67, de rétrovirus incapables de se reproduire.

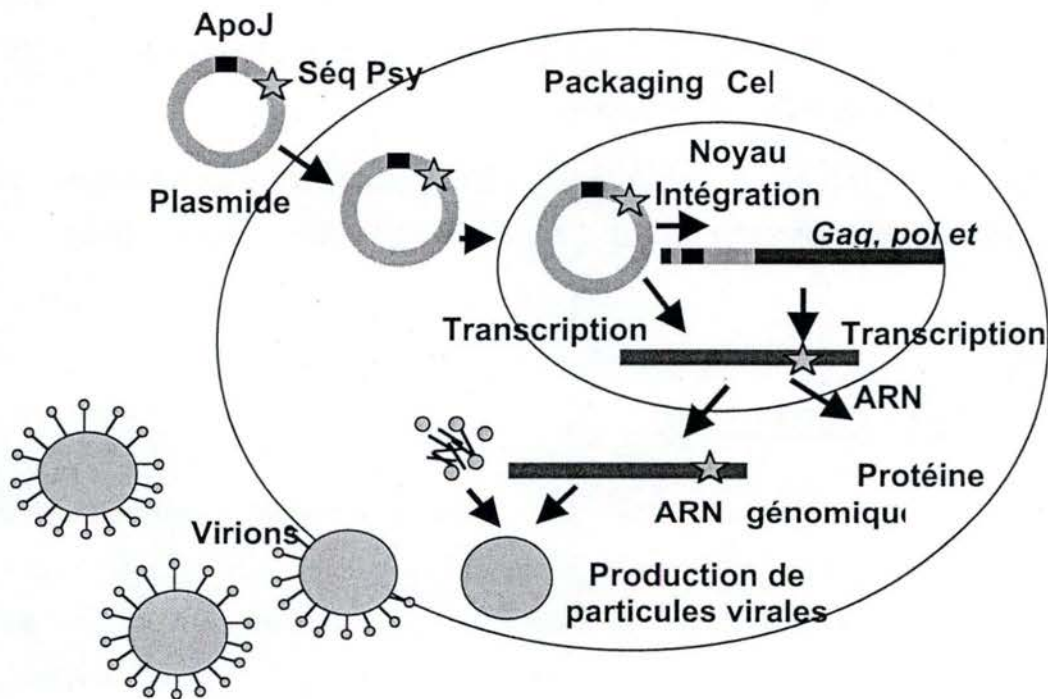


Figure I-13 : Production de rétrovirus infectieux mais incapables de se reproduire à partir d'un plasmide. Un plasmide encodant une résistance à la néomycine, un gène d'intérêt : l'apo J, et la séquence d'emballage ψ (mais pas les gènes *gag*, *pol* et *env*) est introduit, via une transfection au CaCl_2 , dans une lignée de cellules d'emballage. Ces cellules ont été transfectées de manière stable avec les gènes *gag*, *pol* et *env* qui encodent les protéines nécessaires à la formation des particules virales. Le plasmide introduit peut soit être exprimé transitoirement (pendant quelques jours après la transfection), soit intégré de manière stable dans le chromosome de l'hôte. Le génome des virus produits encode donc pour la séquence ψ , la protéine apo J et la résistance à l'antibiotique. *Pro* est un promoteur interne permettant la transcription du gène *néomycine*. Cette résistance à l'antibiotique peut être exploitée pour sélectionner les cellules ayant été transfectées de manière stable avec le plasmide (Ausubel *et al.*, 1996).

sein du chromosome de la cellule hôte. Or, ici, il est important que la surexpression se fasse tout le long des stress et encore plusieurs jours après ceux-ci, avant l'étude des biomarqueurs de la sénescence. Donc l'intégration au sein du chromosome de la cellule hôte est indispensable. La transfection rétrovirale s'impose donc ici.

Le vecteur employé est un rétrovirus infectieux privé des gènes lui permettant de se répliquer. Son génome comporte un morceau d'ADN_c non viral. Toutefois le rétrovirus reste capable d'infecter et d'introduire son génome au sein de cellules eucaryotes mitotiques. C'est sa machinerie d'intégration qui est exploitée pour intégrer de manière stable une copie du génome viral dans le chromosome de la cellule hôte.

Toutefois, la transfection rétrovirale possède ses limites :

- le travail contient toujours une manipulation de virus qui n'est pas toujours sans danger,
- le génome rétroviral fait un maximum de 11kb, dès lors, les grands ADN_c exogènes ne peuvent être empaquetés ou le sont très difficilement,
- pour que la transfection ait lieu, les cellules doivent être mitotiques : la mitose est nécessaire à l'entrée du complexe d'intégration rétroviral dans le noyau.

Le génome rétroviral est constitué uniquement d'ARN. Celui-ci produit une copie d'ADN, par transcription inverse, immédiatement après l'infection de la cellule hôte en passant par une série d'étapes impliquant à la fois des facteurs rétroviraux et des facteurs de l'hôte. L'ADN rétroviral s'intègre alors dans le génome de l'hôte et prend le nom de provirus.

Pour la transfection stable, il est important que les rétrovirus soient incapables de se reproduire mais restent toutefois capables d'infecter des cellules. Ceux-ci sont produits par des cellules dites d'empaquetage (**Figure I-13**). Ces cellules contiennent au sein de leur génome une copie des gènes *gag*, *pol* et *env* nécessaires à la production des différents composés viraux. Ces gènes ont été insérés dans le génome séparément afin de limiter les risques de recombinaison et de formation de rétrovirus capables de se reproduire. Les rétrovirus contenant le gène d'intérêt sont produits en transfectant un plasmide rétroviral dans les cellules d'empaquetage. Ce plasmide contient la séquence de la protéine d'intérêt ainsi qu'une séquence "psi" d'empaquetage (ψ^+), mais est dépourvu des gènes *gag*, *pol* et *env*. Ce plasmide, après intégration dans le génome ou directement, va être transcrit en ARN. L'ARN sera encapsidé par les protéines virales de structure produites par la cellule d'empaquetage. De nouvelles particules virales peuvent alors émerger de la surface cellulaire. Ainsi les

Infection de cellules cibles par des rétrovirus incapables de se reproduire.

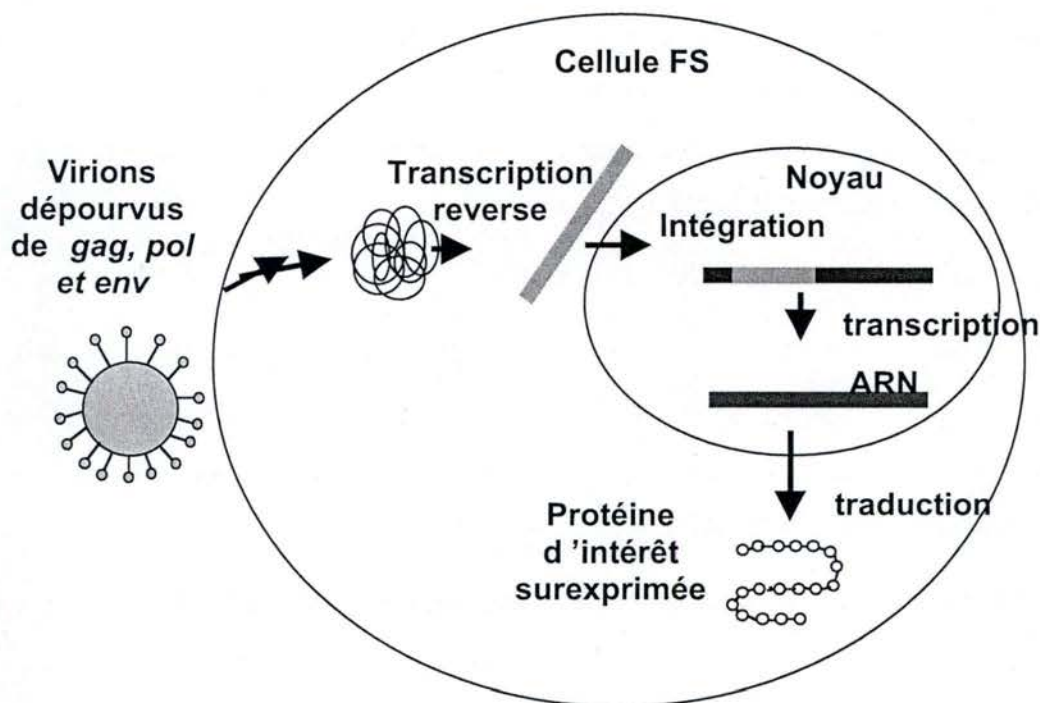


Figure I-14 : Infection de cellules cibles par des rétrovirus incapables de se reproduire. Dans ce cas, le transcrit rétroviral ne code pour aucune des protéines requises pour construire la capsid virale mais plutôt pour le gène X d'intérêt, le gène de résistance à l'antibiotique (néomycine) et la séquence d'emballage. Puisque les gènes *gag*, *pol*, et *env* ne se retrouvent ni dans les rétrovirus de départ, ni dans les cellules cibles, celles-ci sont incapables de produire de nouveaux rétrovirus (Ausubel *et al.*, 1996).

cellules d'emballage produisent des rétrovirus dont le génome n'est constitué que de l'ARN dérivé du plasmide introduit, et donc sans les gènes *gag*, *pol* et *env*. Le surnageant des cellules d'emballage sera alors récupéré pour infecter les cellules cibles (**Figure I-14**), dans notre cas, les fibroblastes de peau de souche FS.

Il existe plusieurs types de cellules dites d'emballage. Chaque lignée exprime les gènes *gag*, *pol* et *env*. C'est *env*, codant pour les protéines d'enveloppe qui va déterminer plus tard le type de cellules que le virus pourra infecter. Par exemple les cellules PT67 comprennent un gène *env* codant pour des protéines dont le récepteur se trouve bien sur les cellules cibles à savoir les fibroblastes de peau.

I.6 La real time PCR.

Cette méthode a été mise au point afin de pouvoir quantifier directement l'expression d'un gène à partir de son ARN messager. On peut réaliser une quantification relative basée sur l'expression relative d'un gène cible et ce, par comparaison avec un gène de référence dont la quantité ne varie pas dans les conditions étudiées (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001; Vandebroucke *et al.*, 2001).

Lors d'une PCR (réaction d'amplification en chaîne), on réalise l'amplification d'un fragment d'ADN, grâce à des amorces spécifiques d'une séquence cible. Afin de détecter l'amplicon, la méthode habituelle est l'électrophorèse sur gel d'agarose qui permet de séparer les molécules d'ADN selon leur poids moléculaire grâce à l'action d'un champ électrique. Les gels contenant du bromure d'éthidium, une molécule intercalante de l'ADN, permettent lors d'une exposition aux ultraviolets de visualiser l'ADN amplifié et de vérifier sa taille grâce à un étalon de masse moléculaire. Cette méthode est relativement longue et sujette à de nombreux risques de contamination (Salmon, 2002).

Une méthode de PCR permettant de détecter l'amplification par fluorescence durant la réaction elle-même a été mise au point : la PCR en temps réel. Celle-ci permet de corréler le nombre d'amplicons avec une intensité de fluorescence. Le fait de lier fluorescence et PCR lors de la PCR en temps réel, permet de combiner l'amplification PCR traditionnelle à la détection du produit, à la quantification de l'ADN amplifié ainsi qu'à la vérification du produit amplifié, en réalisant une courbe d'analyse des températures de melting (Pfaffl, 2001).

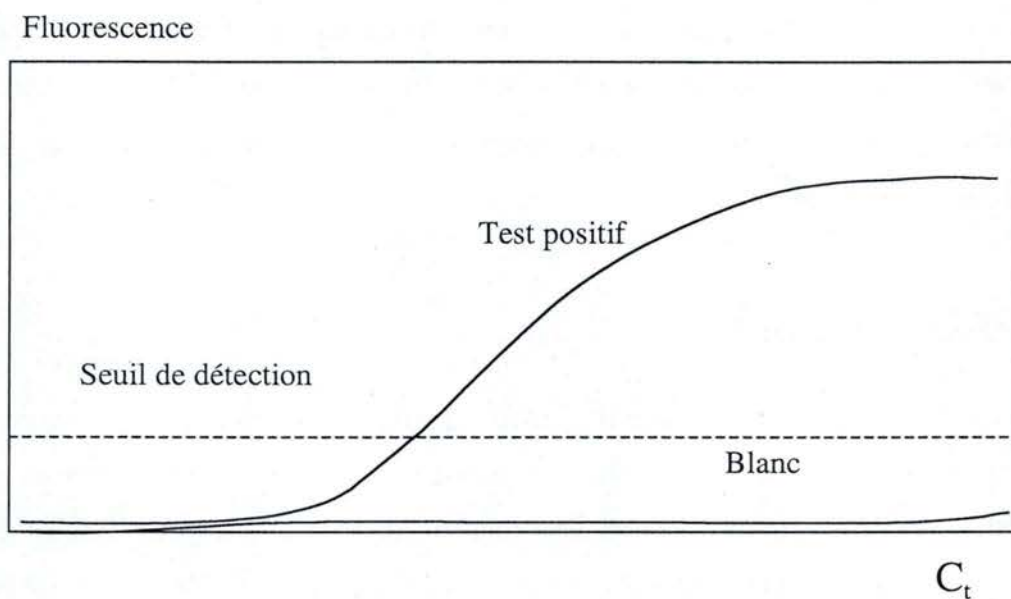


Figure I-15 : Courbe illustrant le réaction « Real Time PCR ». La fluorescence émise par le produit PCR lié au Syber Green n'est détectable qu'à partir d'un certain seuil. L'amplification exponentielle est suivie d'une phase linéaire et enfin d'une phase plateau correspondant à l'épuisement des réactifs de la PCR.

Après extraction de l'ARN messager d'une cellule, celui-ci est rétro-transcrit, ce qui donnera de l'ADN_c. En fonction des séquences à amplifier, des amorces spécifiques seront choisies. En plus des composants habituels du mélange réactionnel de PCR, du SYBR Green est ajouté. Il s'agit d'une molécule intercalante capable d'émettre un signal fluorescent lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin. Le signal quantifié est proportionnel à la quantité d'amplicons à la fin de chaque cycle PCR. Ce signal fluorescent permet donc de suivre la PCR au cours du temps et de déterminer la phase exponentielle de l'amplification. En fonction des conditions de travail, un gène de référence est choisi dont la quantité ne varie pas dans les conditions étudiées, ce qui permet donc de quantifier le niveau d'expression du gène étudié par comparaison à la référence. La comparaison sera toujours réalisée au milieu de la phase exponentielle d'amplification car à ce moment aucun réactif de la réaction n'est déjà épuisé. De plus, il faut qu'un minimum de produit soit formé car la fluorescence n'est détectable qu'à partir d'un certain seuil d'intensité de fluorescence. Ensuite une analyse mathématique permet de quantifier le produit du gène étudié (**Figure I-15**).

Un des risques majeurs de ce système est l'amplification de produits parasites. Ceux-ci sont fondus dans le signal fluorescent. Toutefois, il est possible de les identifier en réalisant une courbe de dissociation. C'est-à-dire qu'une fois l'ensemble des cycles réalisés, un gradient de température est réalisé jusqu'à 95°C. Au fur et à mesure que la température augmente, en fonction des températures de melting, les produits vont se dissocier. Une fois le SYBR Green libéré dans l'environnement, l'intensité de fluorescence diminue fortement. Dès lors, en fonction des différentes températures de melting relevées, il est possible d'identifier les produits présents parmi les amplicons sur base de la diminution de fluorescence.

Cette méthode, totalement automatisée, permet de quantifier, au fur et à mesure de la PCR, les amplicons. De plus, ce type de PCR limite fortement les risques de contaminations vu que toute la manipulation se fait en un seul temps et elle ne nécessite pas de manipulations de détection post PCR. Toutefois, une mise sur gel d'agarose permet de confirmer l'amplification mais uniquement sur base de la taille attendue de l'amplicon.

I.7 But du mémoire

Le but général est tout d'abord d'étudier les biomarqueurs de la sénescence répllicative, lors de la SIPS induite par les U.V.B. Nous examinerons dans un premier temps la présence de l'activité SA- β gal ainsi que l'incorporation de la [3H]-thymidine dans l'ADN. Ensuite, nous vérifierons le niveau relatif de transcrits de différents gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence induite suite à des stress aux U.V.B à doses subcytotoxiques au sein des fibroblastes FS. Parmi les candidats étudiés, l'apo J, connue dans la littérature comme une protéine pouvant conférer une protection contre différents stress. L'apo J étant un candidat intéressant, nous étudierons son niveau protéique en SIPS induite par les U.V.B. Si la modification de niveau de transcrit s'accompagne d'une augmentation de sa quantité protéique, dans des cellules exposées à des stress sous U.V.B, il sera intéressant d'étudier le rôle de la surexpression de l'apo J.

Dans ce but ultime, il faut obtenir une lignée stable de fibroblastes FS surexprimant l'apo J. Le système idéal pour réaliser des transfections stables dans les fibroblastes FS non immortalisés, est la transfection rétrovirale. Pour cela, différentes constructions de plasmides seront réalisées pour aboutir finalement au plasmide rétroviral pLXSN, contenant l'apo J "taggée" ou non. Le tag 6 His/V5 permettra de discriminer l'apo J endogène de l'apo J recombinante. La protéine non "taggée" permettra de contrôler une éventuelle influence du "tag" sur le rôle de la protéine.

La construction intermédiaire servant à greffer le tag, sera testée en effectuant d'abord diverses transfections transitoires, pour confirmer l'expression de la protéine recombinante au sein des cellules, et ensuite des transfections stables au sein de fibroblastes immortalisés SV-40, afin de réaliser divers stress cytotoxiques aux U.V.B ainsi qu'au t-BHP et à l'EtOH. A l'issue de ce travail, nous serons placés dans des conditions idéales pour la phase finale de transfection rétrovirale de fibroblastes FS et étudier dans un futur proche, le rôle de l'apo J sur la protection des cellules contre la SIPS induite par les U.V.B.

**Matériels
et
Méthodes**

II MATERIELS ET METHODES

II.1 Culture cellulaire

II.1.1 Culture de fibroblastes FS

Les cellules FS sont des fibroblastes de peau, fœtaux d'origine humaine (AG04431). Ces cellules proviennent du « Corriel Cell Institute ».

II.1.1.1 Repiquage des fibroblastes FS

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (**Figure II-1**). Elles sont cultivées en routine dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75). Quand elles sont à confluence, soit quand elles atteignent la densité moyenne de 20 000 cellules par cm², elles sont repiquées dans des conditions stériles.

II.1.1.1.1 Matériel

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

BME (Basal Medium Eagle, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml)-Streptomycine (50 µg/ml) (Bio-Whittaker, Verviers, Belgique))

Fungizone (0.25U/ml) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

L-Glutamine (2mM) (Sigma, St-Louis, U.S.A.)

Trypsine : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l Na HCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Boîtes de culture stériles (75 cm²= T75) (Corning, Cambridge, U.S.A.)

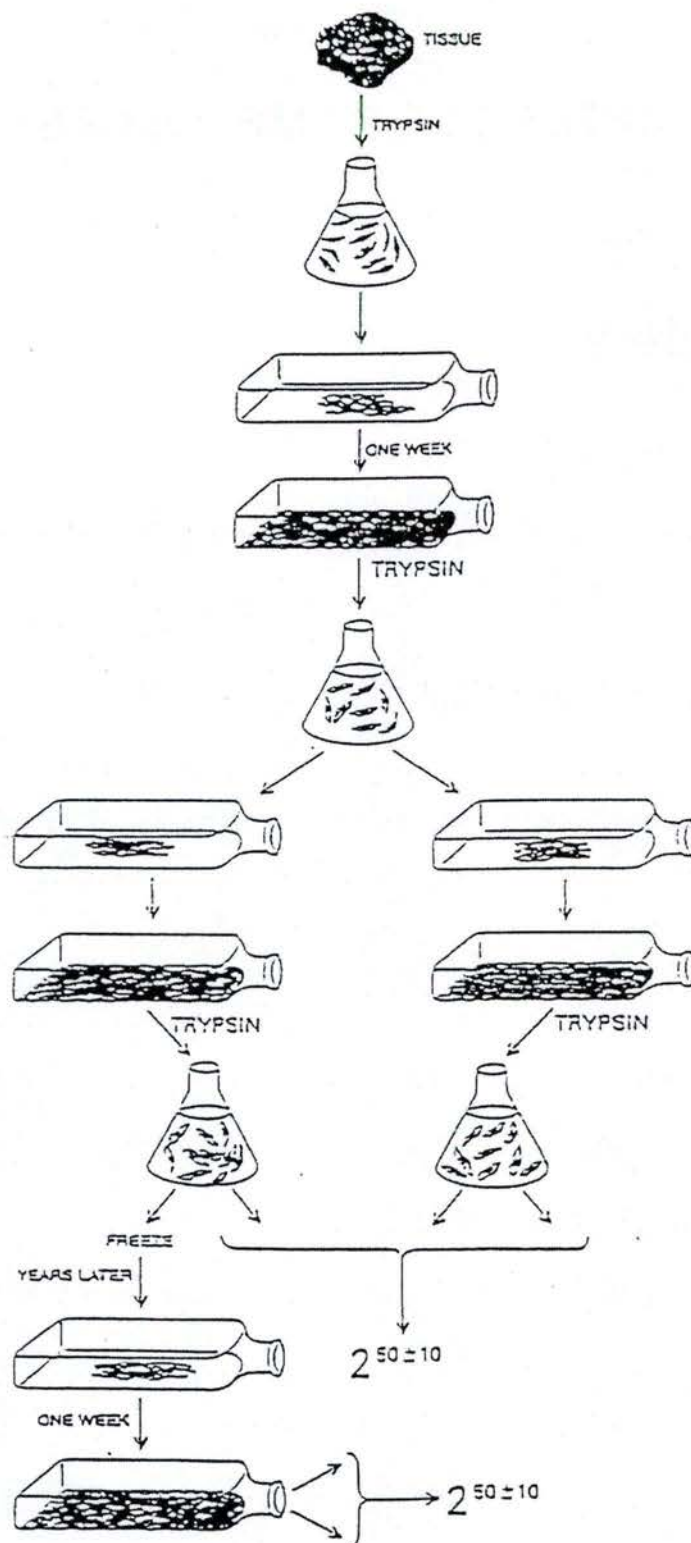


Figure II-1: Schéma représentant le principe de culture cellulaire sériée (Hayflick *et al.*, 1961).

II.1.1.1.2 Méthode

Décanter le milieu et rincer les cellules 2 fois avec du milieu de rinçage (PBS). Ceci permet d'éliminer les inhibiteurs de trypsine présents dans le milieu.

Ajouter 2 ml de trypsine et laisser agir jusqu'à l'arrondissement des cellules.

Décanter l'excédent de trypsine.

Laisser agir environ 10 minutes à 37°C, température optimale d'action de la trypsine (jusqu'à ce que les cellules se détachent de la boîte).

Ajouter 10 ml de milieu BME + 10 % FBS.

Homogénéiser les agrégats cellulaires avec une pipette pasteur.

Répartir ce milieu en 2 ou 4 nouvelles T75 auxquelles du BME + 10 % FBS sera ajouté pour arriver à un volume final de 15 ml par T75.

Mettre les boîtes dans une étuve à 37°C diffusant de l'air chargé de 5 % de CO₂ en laissant le bouchon légèrement ouvert afin d'ajuster le pH du milieu de culture.

II.1.1.2 Congélation et décongélation des fibroblastes FS

II.1.1.2.1 Préparation des solutions

Par tube de congélation il faut :

- 0,4 ml milieu BME + 40 % FBS,
- 0,4 ml milieu BME + 20 % DMSO (Diméthylsulfoxyde : agent cryoprotecteur utilisé lors de la congélation des cellules (Merck, Darmstadt, Allemagne))

II.1.1.2.2 Congélation

Décanter le milieu des cellules.

Rincer 2 fois avec du milieu de rinçage (PBS).

Ajouter 2 ml de trypsine.

Décanter l'excédent et mettre 10 minutes à 37°C.

Resuspendre dans 10 ml de milieu BME + 10% FBS.

Centrifuger pendant 10 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne).

Décanter le milieu.

Resuspendre le culot dans 0,4 ml de BME + 40 % FBS puis mettre ce mix dans une ampoule (Corning, Cambridge, USA) et homogénéiser avec 0,4 ml de BME + 20 % DMSO.

L'ampoule est ensuite placée à -70°C dans un système de congélation progressive, avant de la mettre à -196°C dans l'azote liquide.

II.1.1.2.3 Décongélation des fibroblastes

Pour décongeler des cellules conservées dans l'azote liquide, l'ampoule de congélation est immédiatement plongée dans un bain à 37°C , ceci afin de décongeler les cellules le plus vite possible.

Ensuite, les cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le culot de cellules ainsi obtenu est resuspendu dans du BME + 10 % FBS avant d'être transféré dans une nouvelle boîte de culture.

Le lendemain, le milieu de culture des cellules est renouvelé afin d'éliminer toute trace de DMSO, toxique pour les cellules.

II.1.2 Culture des fibroblastes SV40

Les cellules WI-38 SV40 VA13 sont des fibroblastes pulmonaires humains WI-38 immortalisés par le virus SV40 (un antigène de sarcomavirus). Elles sont fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.).

II.1.2.1 Repiquage des fibroblastes SV40

II.1.2.1.1 Matériel

MEM (Minimum Essential Medium (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne))

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

Antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml)-Streptomycine (50 $\mu\text{g/ml}$) (Bio-Whittaker, Verviers, Belgique))

Trypsine : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l Na HCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Boîtes de culture stériles (75 cm²= T75) (Corning, Cambridge, U.S.A.)

II.1.2.1.2 Méthode

Les conditions utilisées sont les mêmes que pour le repiquage des cellules FS excepté que le milieu BME est remplacé par du milieu MEM.

II.1.2.2 Congélation et décongélation des fibroblastes SV40

Les conditions utilisées sont les mêmes que pour le repiquage des cellules FS excepté que le milieu BME est remplacé par du milieu MEM.

II.1.3 Culture des cellules COS

Ce sont des cellules de rein de singe immortalisées avec l'antigène SV40. Elles sont fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.).

II.1.3.1 Matériel

DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne))

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

Antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml)-Streptomycine (50 µg/ml) (Bio-Whittaker, Verviers, Belgique))

Fungizone (0.25U/ml) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Trypsine EDTA : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l Na HCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Boîtes de culture stériles (75 cm²= T75) (Corning, Cambridge, U.S.A.)

II.1.3.2 Méthode

Les conditions utilisées sont les mêmes que pour le repiquage des cellules FS et SV40, excepté que le milieu BME ou MEM est remplacé par du milieu DMEM. Toutefois, la trypsine utilisée étant de la trypsine EDTA, les cellules détachées sont centrifugées afin d'éliminer l'EDTA. Elles sont ensuite resuspendues dans du milieu DMEM.

<i>jour 1</i>	<i>jour 2</i>	<i>jour 3</i>	<i>jour 4</i>	<i>jour 5</i>	<i>jour 6</i>	<i>jour 7</i>	<i>jour 8</i>
Stress 1 Stress 2	Stress 3 Stress 4	Stress 5 Stress 6	Stress 7 Stress 8	Stress 9 Stress 10	Repos	Repos	SIPS

Dose U.V.B/stress: 250 mJ/cm²

Figure II-2 : Modèle utilisé pour réaliser les stress U.V.B à doses subcytotoxiques et répétées.

II.2 Stress subcytotoxiques aux U.V.B

Les stress sont réalisés sur des cellules repiquées en T75 ou en petites boîtes de pétri (diamètre = 35 mm).

II.2.1 Matériel

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

BME + 1 % FBS (Milieu BME additionné de 1% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne))

Lampe U.V.B (TL 20 W/01) (Philips, The Netherlands)

Radiomètre et capteur U.V.B (Biologix Scientific, Belgium)

II.2.2 Méthode

(Figure II-2)

72 heures avant le premier stress, les cellules FS sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules/cm².

Avant de réaliser les stress, le milieu est décanté.

Les cellules sont rincées une fois au PBS, puis additionnées d'une fine couche de PBS pour l'exposition aux U.V.B.

La dose d'U.V.B est limitée à 250 mJ/cm² par stress. Ceci est vérifié par l'utilisation d'un radiomètre.

Après le stress, le PBS est décanté et du BME + 1 % FBS est ajouté aux cellules.

Afin de voir apparaître la SIPS, on réalise 10 stress successifs à raison de 2 stress/jour pendant 5 jours.

II.3 Stress cytotoxiques à l'éthanol, au t-BHP et aux U.V.B

II.3.1 Matériel

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

MEM (Minimum Essential Medium (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne))

tert-butylhydroperoxyde (*t*-BHP)(Merck, Darmstadt, Allemagne)

Ethanol absolu (EtOH) (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Lampe U.V.B (TL 20 W/01) (Philips, The Netherlands)

Radiomètre et capteur U.V.B (Bioblock Scientific, Belgium)

II.3.2 Méthode

Les cellules SV40 sont repiquées 24 heures avant le stress à une confluence de 50 000 cellules / cm², soit en plaques 24 puits (stress *t*-BHP et EtOH), soit dans des petites boîtes de pétri (diamètre de 35 mm) (stress U.V.B).

II.3.2.1 Stress au *t*-BHP et à l'EtOH

Avant le stress, le surnageant des cellules est décanté et les cellules sont incubées durant 2 heures avec du MEM + *t*-BHP (de 0 à 1.5 mM) ou du MEM + EtOH (de 0 à 8% v:v).

Après le stress, le milieu est décanté, les cellules sont rincées 2 fois au PBS puis incubées 24 heures dans du MEM + 10% FBS à 37°C avec 5% de CO₂.

II.3.2.2 Stress aux U.V.B

Avant le stress, le surnageant des cellules est décanté et les cellules sont rincées une fois au PBS.

Ajouter 400 µl de PBS aux cellules par boîte de pétri.

Les cellules sont alors exposées à des doses croissantes en U.V.B (de 0 à 5000 mJ/cm²).

Après le stress, le PBS est décanté et du MEM + 10% FBS est ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées 24 heures à 37°C avec 5 % de CO₂.

II.4 Transfection cellulaire

Dans le cadre de ce travail, plusieurs types de transfection ont été réalisés. En effet, à chaque type cellulaire ainsi qu'à chaque but poursuivi, correspond une méthode optimale de transfection.

II.4.1 Transfection au Superfect

Afin de vérifier la surexpression de l'apo J, nous avons réalisé dans un premier temps, une transfection transitoire dans les cellules COS. Pour cela, nous avons utilisé la transfection au Superfect basée sur l'utilisation de dendrimères actives permettant l'intégration de l'ADN dans les cellules.

II.4.1.1 Matériel

Milieu DMEM + 10 % FBS (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)

Superfect (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Antibiotiques (Pénicilline (50 U/ml)-Streptomycine (50 µg/ml) (Bio-Whittaker, Verviers, Belgique))

Hepes (10mM)(Acros Organics, New Jersey, U.S.A)

II.4.1.2 Méthode

24 heures avant la transfection, les cellules sont repiquées à une confluence de 100 000 cellules/puits en plaques 6-puits.

2 µg d'ADN sont dilués dans 100 µl de milieu DMEM.

Ajouter 10 µl de Superfect à la solution et mélanger doucement.

Incuber 5 à 10 minutes à température ambiante.

Pendant ce temps, décanter le milieu des cellules et rincer avec 2 ml de PBS.

Ajouter 600 µl de DMEM + 10 % FBS au mélange ADN-Superfect et homogénéiser.

Transférer ce mélange dans chaque puits.

Incuber 3 heures à 37°C avec 5 % de CO₂.

Décanter le milieu et rincer une fois au PBS.

Ajouter aux cellules 2 ml de DMEM + 10 % FBS.

II.4.2 Transfection à la phosphatase alcaline

(Kit : CalPhos Mammalian Transfection, Clontech, Californie, USA)

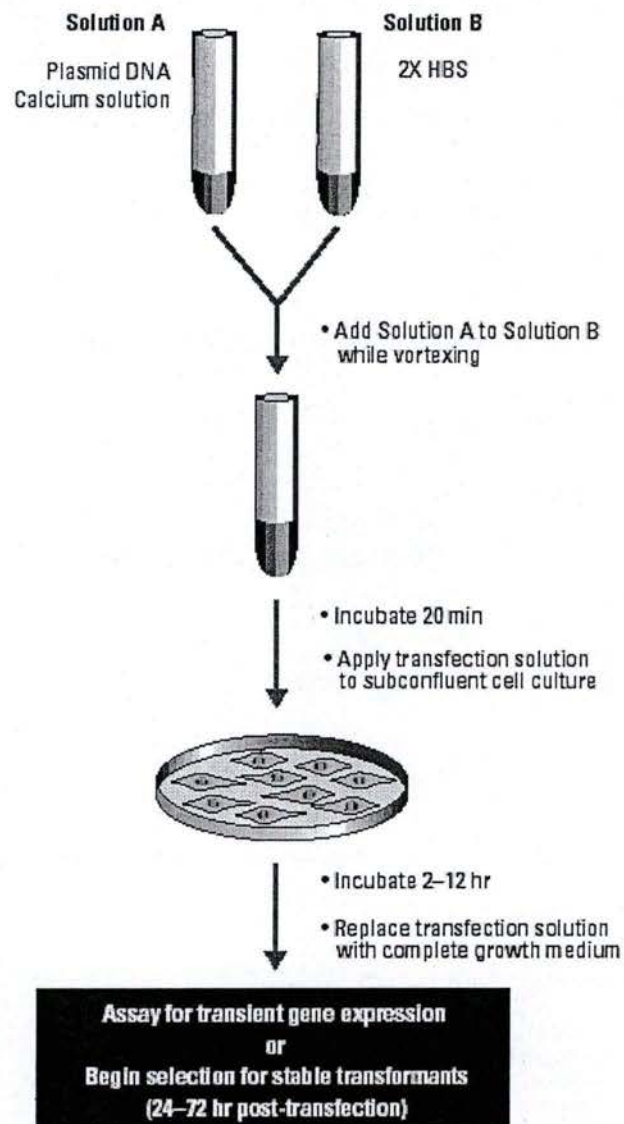


Figure II-3 : Méthode à suivre lors de l'utilisation du kit de transfection à la phosphatase alcaline (Clontech, Californie, USA).

Afin de vérifier l'influence d'une surexpression de l'apo J, des fibroblastes SV40 ont été transfectés par la méthode de la phosphatase alcaline. Cette méthode permet d'introduire plus ou moins facilement de l'ADN plasmidique au sein de différents types cellulaires. La solution de calcium perméabilise la membrane cellulaire et permet ainsi l'entrée d'ADN exogène.

II.4.2.1 Matériel

Solution Calcium 2M (Clontech, USA)

HEPES-Buffered Saline 2X (Clontech, USA)

H₂O stérile

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)

ADN plasmidique

MEM + 10 % FBS (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

II.4.2.2 Préparation des solutions

Solution A :

- 30 µg d'ADN plasmidique,
- 111,6 µl de solution Calcium 2M,
- H₂O stérile pour ajuster le volume final à 900 µl.

Solution B : 900 µl de HBS 2X.

II.4.2.3 Méthode

Les cellules sont repiquées dans des T75 24 heures avant la transfection, afin d'être à une confluence de 50 à 80 % le jour de la transfection (= 2×10^6 cellules/T75).

3 heures avant la transfection, changer le milieu de culture des cellules.

Au moment de la transfection (**Figure II-3**), mélanger doucement la solution A avec la solution B.

Incuber la solution de transfection à température ambiante pendant 20 minutes.

Vortexer cette solution avant de la verser sous forme de gouttes sur les cellules.

Incuber les plaques à 37°C dans l'incubateur à 5 % de CO₂ pendant 6 heures.

Enlever la solution de transfection puis rincer 2 fois au PBS.

Ajouter du MEM + 10 % FBS et mettre les cellules dans l'incubateur.

24 à 72 heures après la transfection, la sélection des cellules transfectées peut commencer via l'utilisation d'un antibiotique de sélection (exemple : pour le plasmide pcDNA3.1.A et le pLXSN = G418, à une concentration de 400µg/ml).

II.4.3 Coloration β -gal pour le vecteur LacZ

Kit β -gal Staining set (Roche, Mannheim, Allemagne)

II.4.3.1 Matériel

x-gal solution

Iron buffer

II.4.3.2 Méthode

Mélanger 1 volume de solution x-gal avec 19 volumes de "iron buffer".

Agiter ce mélange pendant 10 minutes.

Rincer les cellules au PBS.

Mettre la solution de coloration sur les cellules.

Observer la proportion de cellules transfectées (= cellules colorées en bleu) après 1 heure.

II.5 Dosage de protéines

II.5.1 Méthode inverse

Kit : PlusOne 2-D Quant Kit (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, U.S.A.)

II.5.1.1 Principe

Dans cette méthode, ce ne sont pas les protéines qui sont dosées directement. Les protéines sont tout d'abord précipitées puis resuspendues dans une solution de cuivre et c'est le cuivre

non lié qui est dosé avec un agent colorimétrique. La densité colorimétrique est inversement proportionnelle à la concentration protéique.

II.5.1.2 Matériel

- Solution de précipitation
- Solution de co-précipitation
- Solution de copper
- Réactif de coloration A
- Réactif de coloration B
- BSA (Bovine Serum Albumine) (2 mg/ml)

(Remarque : il faut préalablement réaliser la solution de coloration constituée de 100 parts du réactif de coloration A pour une part de réactif de coloration B)

II.5.1.3 Méthode

A partir d'une solution de BSA 2mg/ml, réaliser une courbe d'étalonnage.

Prélever 50 µl de chaque échantillon à doser.

A chaque tube, ajouter 500 µl de précipitant.

Ensuite, ajouter 500 µl de co-précipitant.

Centrifuger 10 minutes à 13 000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne).

Décanner le surnageant.

Centrifuger à nouveau les tubes 10 minutes à 13 000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne).

Décanner le surnageant.

Resuspendre le culot dans 100 µl de la solution de copper, ensuite ajouter 400 µl de dH₂O.

Ajouter 1ml de réaction de coloration.

Incuber à température ambiante pendant environ 15 à 20 minutes puis lire la densité optique à 480 nm.

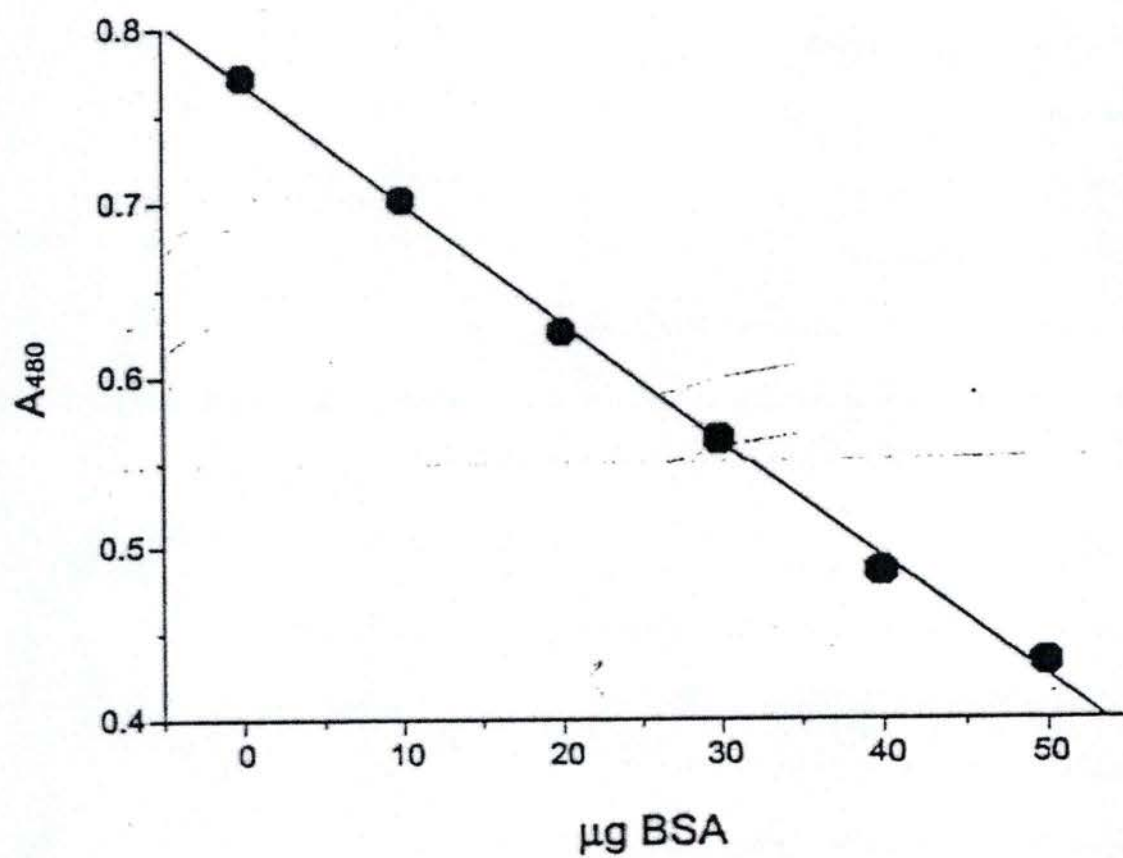


Figure II-4: Exemple d'une courbe standard réalisée après dosage de la BSA par la méthode inverse.

Calculer la concentration des échantillons en se rapportant à la courbe d'étalonnage réalisée (Figure II-4).

II.5.2 Méthode de Lowry

Les protéines cellulaires peuvent être dosées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron Instruments, Italie) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

II.5.2.1 Matériel

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)

BSA (Bovine Serum Albumin) à 200 µg/ml (Sigma, St-Louis, U.S.A.)

NaOH 0,5 N et 1 N (Merck, Darmstadt Allemagne)

Mixture alcaline à préparer juste avant l'emploi :

- 2 % carbonate de sodium Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- 0,01 % sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- 0,02 % tartrate de sodium/potassium $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Réactif phénol de Folin-Ciocalteu (Sigma, St-Louis, U.S.A.) à diluer 2 fois avant utilisation.

II.5.2.2 Méthode

Rincer les cellules deux fois avec du PBS.

Ajouter 1 ml de NaOH 0,5 N et laisser agir pendant 30 minutes, pour dénaturer les protéines.

Homogénéiser les lysats et les aliquoter en fractions de 0,4 ml.

Ajouter 2 ml de mixture alcaline à chaque fraction de 30 sec en 30 sec puis incubé 15 min.

En respectant le temps et l'ordre des tubes, ajouter 0,2 ml de réactif de Folin dilué deux fois à chaque fraction et agiter immédiatement.

Après 30 minutes de réaction, lire la densité optique (D.O.) à 660 nm.

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = 100 \times \frac{\text{D.O. échantillon} - \text{D.O. blanc}}{\text{D.O. étalon} - \text{D.O. blanc}} \times \text{dilution}$$

II.6 Détection des biomarqueurs de la sénescence

II.6.1 Activité SA- β -gal

II.6.1.1 Matériel

II.6.1.1.1 Solution de fixation

- Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Belgique),
- Glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Pays-Bas),
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4).

II.6.1.1.2 Solution de coloration

- Na Cl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- Tampon hydrogénophosphate de sodium 40 mM pH6,0 :
 - Na H₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
 - Na₂ HPO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- Ferrocyanure de Potassium 5mM (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- Ferricyanure de Potassium 5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- Mg Cl₂ 2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne),

- 1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (x-gal) (Eurogentec, Seraing, Belgique). Solution stock à 20 mg/ml dilué dans du N, N' diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique) conservé à -20°C .

II.6.1.1.3 Traitement des cellules

- Méthanol (Acros Organics, New Jersey, U.S.A.),
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4).

II.6.1.2 Méthode

48 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à faible densité (1000 cellules/cm²) dans des petites boîtes de pétri (diamètre = 35 mm).

Le lendemain, le milieu de culture des cellules est décanté.

Ensuite, les cellules sont rincées 2x avec du PBS.

Puis, elles sont fixées 5 minutes dans la solution de fixation.

Les cellules sont ensuite rincées à nouveau 2x avec du PBS.

Ensuite, on les incube avec 2 ml de solution de coloration pendant 12 à 16 heures à 37°C et sans CO₂.

Quand la coloration est nette, les cellules sont rincées 2x au PBS, puis séchées au méthanol.

On peut dès lors déterminer la proportion de cellules positives à l'activité SA β -gal (bleues) par rapport aux cellules ne possédant pas cette activité.

II.6.2 Incorporation de la [3H]-thymidine

II.6.2.1 Matériel

NaOH 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

HCl 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (SDS, France)

Ethanol 70 % (SDS, France)

Trypsine 0,25 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)

BME (Basal Medium Eagle, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4).

Thymidine tritiée (NEN, Boston, USA)

Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)

Compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, U.S.A.)

II.6.2.2 Méthode

24 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules/puits dans une plaque 24-puits dans du milieu BME + 1 % FBS additionné de 1 μ Ci/ml de thymidine tritiée.

Les boîtes sont ensuite incubées 48 h dans une étuve à 5 % de CO₂ afin de permettre l'incorporation de thymidine tritiée.

Les boîtes sont alors rincées 2x avec 1 ml de PBS. Puis elles sont rincées 1x avec 1 ml de TCA 10% (préalablement refroidi sur glace), 1x à l'éthanol 70 % et 1x au PBS.

Ensuite, 250 μ l de NaOH 0,5 M leur sont ajoutés. Après 30 minutes, la réaction est neutralisée en ajoutant 250 μ l d'HCl 0,5 M.

Après homogénéisation à la pipette Pasteur, les 500 μ l de lyse sont repris dans une fiole contenant 5 ml d'Aqualuma. La fiole est ensuite agitée et placée dans le compteur à scintillation.

II.7 Concentration de protéines

Afin de concentrer les protéines du milieu des cellules, le système « Millipore » (Millipore Corporation, Bedford, U.S.A.) a été utilisé. Ce système permet, à partir du surnageant, de ne garder que les protéines d'un certain poids moléculaire. Une membrane permet d'arrêter les protéines et de laisser passer le milieu. Le surnageant récupéré est posé sur la colonne, celle-ci est ensuite centrifugée à 4500 rpm, et toutes les 5 minutes le niveau de concentration des protéines est vérifié.

II.8 Western blot

II.8.1 Principe

La première étape consiste à séparer les protéines d'un extrait cellulaire ou les protéines sécrétées dans le milieu en fonction de leur poids moléculaire. Celle-ci est réalisée en chargeant les extraits ou le milieu concentré sur un gel de polyacrylamide (de pourcentage déterminé). Ce gel sera soumis à une différence de potentiel provoquant la migration et donc la séparation des protéines. Un marqueur de poids moléculaire, composé de diverses protéines de taille connue, est nécessaire pour repérer le poids de la protéine recherchée et ainsi la situer.

La seconde étape est une étape de transfert. Elle se fait par la migration des protéines contenues dans le gel sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). Lorsque le matériel se trouve sur cette membrane, celle-ci est soumise à un blocage afin de minimiser la fixation non spécifique de l'anticorps primaire. Le blocage est souvent réalisé au moyen d'une solution contenant du lait.

Ensuite, on ajoute un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Un contrôle de charge est effectué avec un anticorps dirigé contre une protéine dont l'expression ne varie pas dans les conditions testées.

La troisième étape consiste à incuber la membrane avec un anticorps secondaire dirigé contre les fragments Fc de l'anticorps primaire. Cet anticorps est couplé à la peroxydase. Enfin, l'étape de révélation est réalisée en ajoutant le substrat de la peroxydase (= peroxyde d'hydrogène) ainsi que du luminol (amplificateur) permettant ainsi l'émission de photons pouvant imprimer sur un film autoradiographique.

II.8.2 Méthode


II.8.2.1 Récupération des extraits et préparation des échantillons

II.8.2.1.1 Récupération des extraits

II.8.2.1.1.1 Lysats cellulaires

II.8.2.1.1.1.1 Matériel

Tampon de lyse : 2% SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Protein	Approx. Molecular Weights (kDa)				
	SDS-PAGE System:				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE [®] MES	NuPAGE [®] MOPS	NuPAGE [®] Tris-Acetate
 Myosin	250 kDa	210 kDa	188 kDa	191 kDa	210 kDa
Phosphorylase B	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE[®] Novex
Bis-Tris 4-12% Gel

Figure II-5: Marqueur de poids moléculaire « See blue » utilisé lors des western blots. La migration des protéines de référence varie en fonction du tampon utilisé (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

10 mM Tris (Merck, Darmstadt, Allemagne)

1 mM EDTA pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

+ complete (α -protéases) (Roche, Mannheim, Allemagne)

II.8.2.1.1.2 Méthode

Enlever le milieu.

Ajouter la solution de lyse.

Gratter les cellules au moyen d'un rateau.

Récupérer le lysat.

II.8.2.1.1.2 Milieux

Pour une protéine sécrétée, prélever les milieux des cellules à étudier.

Filtrer les milieux.

Concentrer au moyen d'un centricon (Millipore, Bedford, USA) afin de ne garder qu'une partie des protéines ayant un poids moléculaire englobant celui de la protéine recherchée.

II.8.2.1.2 Préparation des échantillons

Aux différents types d'extraits, du tampon de charge *Sample buffer* 4x (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) est ajouté. Si on travaille en conditions non réductrices, ce tampon de charge seul est ajouté aux échantillons. Par contre en conditions réductrices, du DTT (50 mM)(Sigma, St-Louis, U.S.A) est additionné au *Sample buffer* 4x et ajouté aux échantillons. Ces échantillons sont alors bouillis à 100°C pendant 5 minutes, refroidis sur glace puis centrifugés pendant quelques secondes à 13 000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne). Ils sont ensuite chargés dans les puits du gel de polyacrylamide. De plus 10 μ l du marqueur de poids moléculaire coloré (See Blue (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)) (**Figure II-5**) sont chargés dans un puits afin de pouvoir situer la protéine recherchée.

II.8.2.2 Préparation des gels et migration

Utilisation de minigel (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

Celui-ci est composé de 2 types de gels (Acrylamide/ bis-Acrylamide 10% de type nuPage).

Le « *stacking* » est un gel qui permet de concentrer les échantillons au fond du puits.

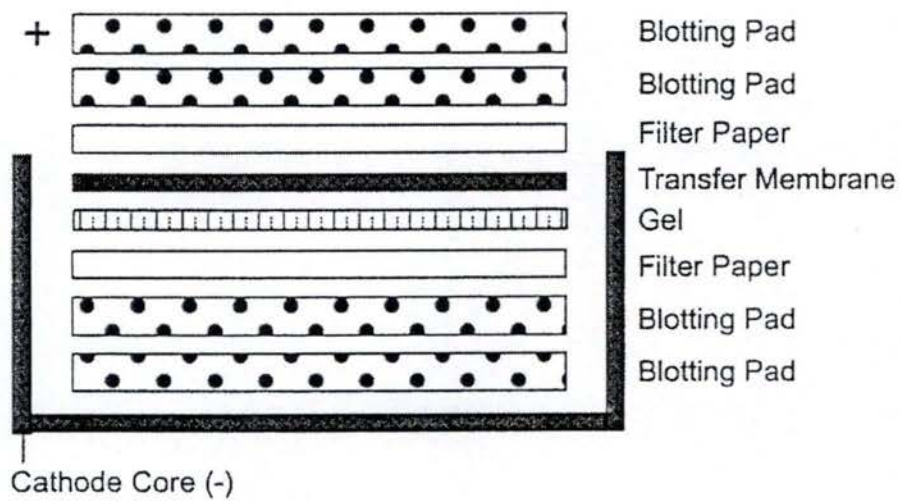


Figure II-6: Réalisation du système sandwich pour le transfert des protéines du gel sur la membrane.

Le « *running* » est un gel qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

Utilisation d'un tampon de transfert : le MOPS (à diluer 20x) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.).

La migration dure 1 heure et se passe à 200 volts ou 400 mA.

II.8.2.3 Transfert sur membrane PDVF

Découper des papiers Whatman (Merck, Darmstadt, Allemagne), les rincer dans du tampon de transfert.

Découper les membranes (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Uppsala, Suède) à la bonne taille.

Hydrater les membranes dans du méthanol pendant 1 minute, puis les rincer dans de l'H₂O, avant de les mettre dans du tampon de transfert (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) pendant 5 minutes.

Réalisation du système sandwich comme expliqué à la **Figure II-6**.

Mettre le système sandwich dans la cuve de transfert.

Le transfert se passe durant 2 heures à 150 mA.

II.8.2.4 Le blocking

Réalisation de la solution de blocking :

- 100 ml TBS (Tris Buffer Saline) 10 x concentré (par litre : 24,22 g Tris ; 80,06 g NaCl ; pH 7,4),
- 900 ml dH₂O,
- 1 ml tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, U.S.A.),
- 5 % lait gloria en poudre à diluer (Gloria, Nestlé, Belgique).

La membrane est incubée pendant une heure sous agitation dans cette solution.

II.8.2.5 Anticorps primaires

L'anticorps primaire est dilué à bonne concentration dans du TBS-t + 5 % gloria.

Anticorps primaires	Origine	Firme
Anti- α tubuline humaine	Mouse	InnoGenex, San Ramon, U.S.A
Anti-V5	Mouse	Invitrogen, Carlsbad, U.S.A
Anti-Apo J humaine	Goat	Rockland, U.S.A
Anti clusterin β humaine	Goat	Santa Cruz Biotechnology, U.S.A

Anticorps secondaires	Origine	Firme
Anti-mouse	Sheep	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne
Rabbit anti-goat	Rabbit	Dako, A/S, Danemarck

Figure II-7 : Récapitulatif des anticorps utilisés lors de ce travail.

Les membranes sont ensuite incubées pendant minimum 2 heures avec l'anticorps primaire avant d'être rincées 3 x 5 minutes avec du TBS-t + 5 % gloria. L'ensemble des anticorps primaires utilisés lors de ce travail est repris à la **Figure II-7**.

II.8.2.6 Anticorps secondaires

L'anticorps est dilué dans du TBS-t + 5 % gloria à bonne concentration. La membrane est incubée 1 heure avec cette solution avant d'être rincée 3 x 5 minutes avec du TBS-t. L'ensemble des anticorps secondaires utilisés lors de ce travail est repris à la **Figure II-7**.

II.8.2.7 Révélation

La membrane est ensuite incubée avec le substrat de la HRP (Pierce, Rockford, U.S.A.). Un film autoradiographique (Hyperfilm MP Amersham, Grande-Bretagne) est exposé sur la membrane en chambre noire, pour des temps variables (de 15 s à 20 min) afin d'obtenir l'exposition optimale, puis placé dans une solution de révélation (Ilford 200 RT, Ilford, Grande Bretagne), lavé à l'eau distillée, fixé dans une solution de fixation (Ilford 200 RT, Ilford, Grande Bretagne) et lavé à l'eau courante.

II.8.2.8 « Stripping » de la membrane

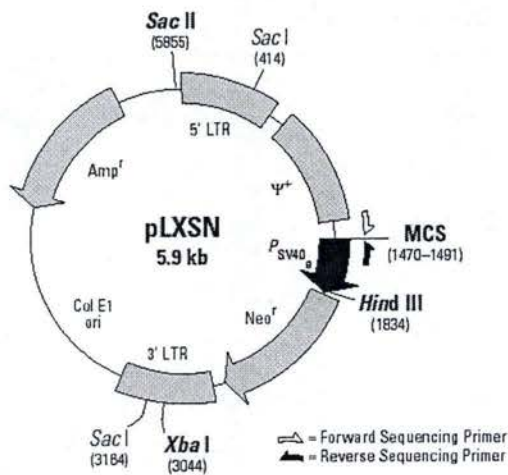
Après réalisation de certains western, la membrane a été strippée, c'est-à-dire que tous les anticorps accrochés à celle-ci sont retirés pour qu'elle puisse être réincubée avec un autre anticorps primaire. La solution employée pour ce faire, est le « Restore Western Blot Stripping Buffer » (Pierce, Rockford, U.S.A.), avec laquelle la membrane est incubée 15 minutes sous agitation. Ensuite, celle-ci est rincée au TBS-t avant d'être bloquée.

II.9 Plasmides et souche bactérienne

II.9.1 Plasmides

II.9.1.1 Le pcDNA3.1 6 His/V5

Le pcDNA3.1.A 6 His/V5 (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) est un plasmide de 5,5 kb contenant un "tag" en c-terminal codant pour l'épitope V5 et pour un signal poly-histidines. Ce "tag" sera ainsi greffé à la protéine qu'on souhaite surexprimer, permettant ainsi de discriminer



1470 1477 1484 1491
 GAATTCGTTAACTCGAGGATCC
 EcoRI HpaI XhoI BamHI

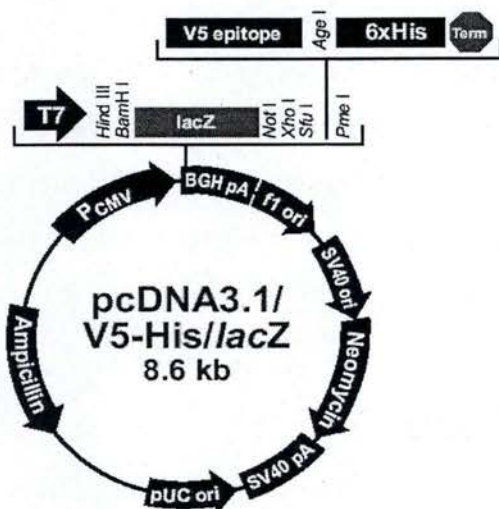
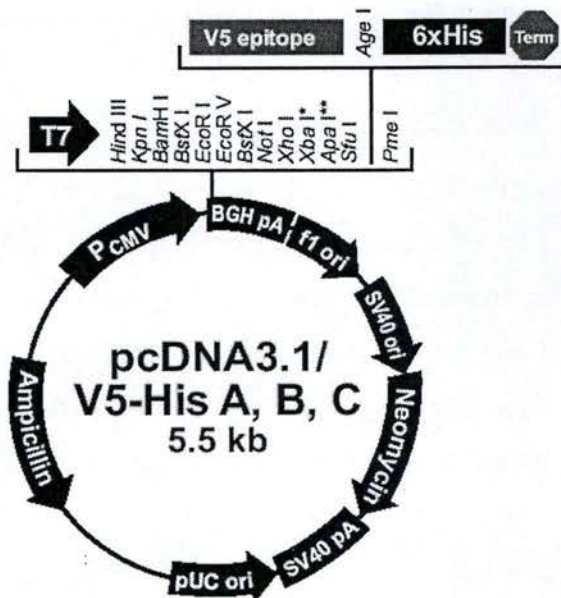


Figure II-8: Schéma des plasmides utilisés lors de ce travail pour les différentes constructions de clonage.

après transfection la protéine recombinante de la protéine native (**Figure II-8**) et/ou de la purifier.

Ce plasmide contient lui aussi différents éléments importants :

- le "early promoter" de SV40 (P_{sv40e}) contrôle l'expression du gène de résistance à la néomycine (Neo^r) qui permet la sélection chez les cellules eucaryotes,
- le "immediate-early promoter" de CMV (P_{CMV}) pour une haute surexpression chez les cellules de mammifères,
- le gène Amp^r pour la sélection dans E.Coli.

Il existe trois phases de lecture afin de faciliter le clonage en phase avec le tag c-terminal.

II.9.1.2 Le pcDNA3.1.A-LacZ

Ce plasmide possède les mêmes éléments importants que le plasmide pcDNA3.1.A et en plus le gène LacZ (**Figure II-8**), qui en présence de son substrat, le x-gal, colore les cellules transfectées avec le plasmide en bleu. Ce plasmide est un contrôle qui permet d'évaluer le taux de transfection des cellules.

II.9.1.3 Le pLXSN

Le pLXSN (Clontech, Palo Alto, USA) est un vecteur rétroviral de 5,9 kb qui contient des éléments dérivés du MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) et du MoMuSV (Moloney Murine Sarcoma Virus) (**Figure II-8**) et est utilisé pour la transfection rétrovirale et l'expression du gène.

Le pLXSN possède différents éléments importants :

- le LTR viral en 5' contient les séquences promoteur/enhancer qui contrôlent l'expression du gène d'intérêt dans le site multiple de clonage,
- le early promoteur de SV40 (P_{sv40e}) contrôle l'expression du gène de résistance à la néomycine (Neo^r) qui permet la sélection des cellules eucaryotes,
- l'origine de réplication Col E1 et le gène Amp^r pour la réplication et la sélection dans E. Coli.

Suite à une transfection d'une lignée de cellules d'emballage (dans notre cas, les PT67), le pLXSN peut être exprimé transitoirement ou intégré et exprimé de manière stable. Le

transcrit résultant contient la séquence Ψ^+ d'empaquetage, le gène d'intérêt cloné entre les deux séquences virales LTR et le marqueur de sélection Neo^r. Les rétrovirus produits transmettent alors le gène d'intérêt aux cellules hôtes, dans notre cas, les fibroblastes FS.

II.9.2 Souche bactérienne

II.9.2.1 Matériel

Colonie de *E. Coli Sure* (Stratagene, La Jolla, U.S.A.)

LB Broth (Difco, Detroit, U.S.A.)

Agar (Difco, Detroit, U.S.A.)

Tétracycline (50 µg/ml) (Sigma, St-Louis, U.S.A.)

Solution de CaCl₂ :

- 10 mM PIPES, pH 7,0 (Sigma, St-Louis, U.S.A.),
- 60 mM de CaCl₂ (Merck, Darmstad, Allemagne),
- 15% glycérol (Merck, Darmstad, Allemagne).

II.9.2.2 Préparation des milieux de culture

II.9.2.2.1 Le milieu Luria Bertani (LB)

II.9.2.2.1.1 Matériel

- LB Broth (Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland, U.S.A.),
- BactoTM Agar (Difco, Detroit, U.S.A.).

II.9.2.2.1.2 Méthode

II.9.2.2.1.2.1 LB liquide

Ce milieu est préparé à partir d'eau distillée additionnée de 2% de milieu LB Broth en poudre.

Autoclaver 25 min à 120°C.

Laisser refroidir et ajouter les antibiotiques éventuels.

Stocker le milieu LB (+ antibiotiques) à 4°C.

II.9.2.2.1.2.2 LB solide

Le milieu LB solide est équivalent au milieu LB liquide auquel on a ajouté 2 % d'agar (Difco, Detroit, USA).

Autoclaver 25 min à 120°C et puis laisser refroidir dans un bain à 55°C.

Ajouter ensuite les additifs désirés (X-gal, IPTG, antibiotiques,...).

Couler rapidement dans les boîtes de Pétri et laisser solidifier.

Il est possible d'ajouter des antibiotiques au milieu LB. L'antibiotique que nous avons utilisé lors de ce travail est l'ampicilline (Sigma, St Louis, USA). Sa concentration stock est de 50 mg/ml et la concentration finale à laquelle elle doit se trouver est de 100 µg/ml.

II.9.2.3 Préparation des bactéries CaCl_2 compétentes

Une préculture est tout d'abord réalisée par inoculation d'une colonie d'*E. Coli Sure* dans 50 ml de milieu LB additionné de tétracycline.

Incuber la pré-culture une nuit à 37°C sous agitation modérée.

Le lendemain, 2 x 2 ml de préculture sont inoculés dans 2 x 250 ml de LB liquide avec tétracycline. Cette culture se développe à 37°C sous agitation modérée jusqu'à ce que sa densité optique à 590 nm atteigne 0,7-0,8 (phase de croissance exponentielle).

Incuber sur glace pendant 10 minutes pour arrêter la croissance de la culture.

Centrifuger pendant 7 minutes, à 4000 rpm et à 4 °C (Beckman J-21B, rotor JA-14).

Resuspendre les culots dans 20 ml d'une solution de CaCl_2 froide.

Réaliser des aliquots de 100 µl sur glace et conserver à -80°C ou utiliser directement pour une transformation.

II.9.2.4 Transformation bactérienne par la méthode du choc thermique

Un aliquot de 100 µl de bactéries CaCl_2 compétentes conservé à -80°C, est dégelé sur glace.

A ces 100 µl, ajouter 10 µl (représentant 10 à 100 ng) de mélange de ligation.

Mettre 10 minutes sur glace.

Réaliser un choc thermique à 42°C pendant 2 minutes.

Ajouter 500 µl de milieu LB liquide.

Incuber 1 heure à 37°C.

Etaler sur boîte de pétri contenant du milieu LB solide + Ampicilline (Sigma, St-Louis, U.S.A.) ou autres antibiotiques.

Incuber à 37°C pendant toute la nuit.

II.10 Extraction ADN plasmidique

II.10.1 Mini préparation d'ADN plasmidique

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- la lyse alcaline des bactéries,
- la précipitation des protéines et des débris cellulaires,
- la précipitation de l'ADN plasmidique,
- le lavage de l'ADN plasmidique,
- la resuspension de l'ADN plasmidique.

II.10.1.1 Solutions

(Kit « Qiagen plasmid purification » (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Tampon P1 : (tampon de resuspension)

50 mM Tris-HCL pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A (conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)

Tampon P2 : (tampon de lyse)

200 mM NaOH, 1 % SDS (conservation à température ambiante)

Tampon P3 : (tampon de neutralisation)

3 M d'acétate de K pH 5,5 (conservation à 4°C)

Phénol : Chloroforme : alcool isoamylique 25 : 24 : 1 (Sigma, St Louis, USA) conservé à 4°C

Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Ethanol Absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Eau distillée

II.10.1.2 Méthode

Pour chaque culture :

Prélever 1,5 ml stérilement dans un microtube.

Centrifuger pendant 5 minutes à 13 000 rpm (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne).

Éliminer le surnageant.

Resuspendre le culot avec une pipette dans 200 µl de tampon P1.

Ajouter 200 µl de tampon de lyse P2 et mélanger doucement.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.

Ajouter 200 µl de tampon P3 et mélanger en retournant 6-8 fois le tube.

Incuber pendant 15 minutes sur glace.

Centrifuger pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C et récupérer 500 µl de surnageant.

Précipiter l'ADN en ajoutant 500 µl de Phénol : Chloroforme.

Homogénéiser en vortexant.

Centrifuger pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C.

Récupérer 400 µl de la phase aqueuse (= phase supérieure) et ajouter 800 µl d'éthanol absolu, puis agiter.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante ou à froid .

Centrifuger pendant 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C puis décanter prudemment.

Laver l'ADN dans 300 µl d'éthanol 70 %.

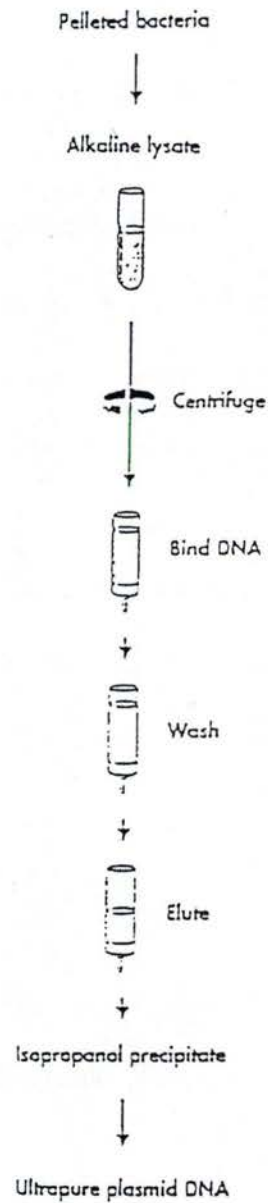
Centrifuger pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C.

Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau distillée.

II.10.2 Maxi préparation d'ADN plasmidique

La maxi-préparation permet de purifier de grandes quantités d'ADN plasmidique. Cette technique utilise une colonne échangeuse d'anions sur laquelle s'adsorbe l'ADN plasmidique,

QIAGEN Plasmid Maxi Kit



Hands-on time	30 minutes
Total time	145 minutes

Figure II-9: Principe de la maxi-préparation d'ADN plasmidique (Qiagen, Hilden, Allemagne).

ce qui permet de le séparer des protéines, des débris cellulaires, de l'ARN et de l'ADN génomique (**Figure II-9**).

II.10.2.1 Solutions et tampons

Kit « Qiagen plasmid purification » (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Tampon P1 : (tampon de resuspension)

50 mM Tris-HCL pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A (conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)

Tampon P2 : (tampon de lyse)

200 mM NaOH, 1 % SDS (conservation à température ambiante)

Tampon P3 : (tampon de neutralisation)

3 M d'acétate de K (conservation à 4°C)

Tampon QBT : (tampon pour équilibrer les colonnes des colonnes)

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % d'isopropanol

0,15 % Triton X-100

Tampon QC : (tampon de lavage)

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % d'isopropanol

Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

II.10.2.2 Méthode

Si le plasmide est un « High Copy »,ensemencer 100 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec 100 µl d'une culture liquide issue d'une mini-culture.

Si le plasmide est un « Low Copy »,ensemencer 250 ml de milieu liquide (LB + antibiotique(s)) avec 1 ml d'une culture liquide issue d'une mini-culture.

Incuber la culture une nuit à 37°C sous forte agitation (250 rpm).

Reprendre 100 ml ou 150 ml de la culture en fonction du type de plasmide à récupérer.

Centrifuger à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JLA-16.250).

Resuspendre le culot dans 10 ml de P1.

Lyser les cellules en ajoutant 10 ml de P2 agiter doucement (en inversant 4 à 6 fois) et laisser incuber à température ambiante durant 5 minutes.

Neutraliser la lyse alcaline en ajoutant 10 ml de P3, agiter doucement (en inversant 4 à 6 fois) puis incuber sur glace pendant 15 à 20 minutes.

Centrifuger à 20 000 g pendant 30 minutes à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20).

Equilibrer la colonne Qiagen-Tip 500 avec 10 ml de tampon QBT et laisser la colonne s'éluer librement.

Une fois la centrifugation terminée, déposer le surnageant sur la colonne (celui-ci contient l'ADN plasmidique) et laisser pénétrer.

Laver la colonne 2 fois avec 30 ml de tampon QC.

Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de tampon QF et récupérer l'éluat.

Précipiter l'ADN avec 0,7 volume (=10,5 ml) d'isopropanol.

Mélanger et centrifuger à 15 000 g (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20) pendant 30 minutes à 4°C.

Décanner le surnageant et laver le culot avec 5 ml d'éthanol 70%.

Centrifuger 10 minutes à 15 000 g à 4°C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-20).

Décanner prudemment le surnageant .

Sécher le culot puis le resuspendre dans 500 µl d'eau distillée.

Conserver à -20°C.

Enzymes	Site reconnu
BamHI	G GATCC
HpaI	GTT AAC
XbaI	T CTAGA

Figure II-10 : Ensemble des enzymes de restriction utilisées lors de ce travail.

II.11 Restriction-ligation d'ADN

II.11.1 Restriction d'ADN

(Ausubel *et al.*, 1996)

Le clivage de l'ADN bicaténaire s'effectue par des enzymes de restriction qui coupent au niveau de courtes séquences d'ADN palindromiques appelées sites de restriction. On dispose à présent d'une batterie très étendue d'enzymes de restriction permettant d'obtenir des fragments d'ADN de tailles différentes en fonction du site reconnu par chacune des enzymes (Figure II-10).

II.11.1.1 Mélange de restriction

Le mélange de restriction contient :

- x μ l d'ADN,
- tampon de restriction 10 X (tampon commercial spécifique de l'enzyme),
- enzyme de restriction: entre 2 et 10 unités d'enzyme par μ g d'ADN.

Incuber le mélange de restriction 1 à 2 heures à la température optimale recommandée par le fournisseur.

II.11.2 Réaction de ligation

L'ADN ligase du bactériophage T4, en présence d'ATP et d'ions Mg^{++} , peut lier de façon covalente les extrémités d'ADN 3'-OH avec des extrémités d'ADN 5'-phosphate, par formation de liaisons phosphodiester 3'-5' propres aux acides nucléiques.

II.11.2.1 Méthode

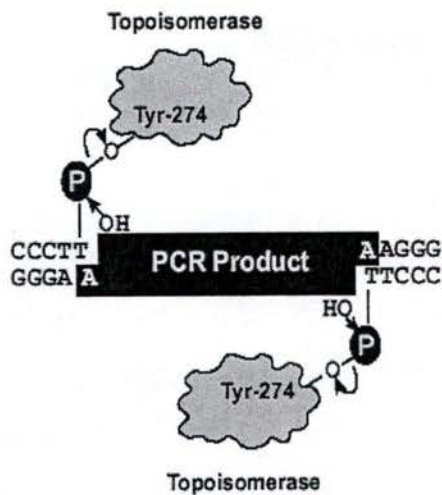
Dans un microtube, placer un mélange des deux fragments à lier.

Ajouter le tampon de ligation 10 x (Promega, Madison, USA).

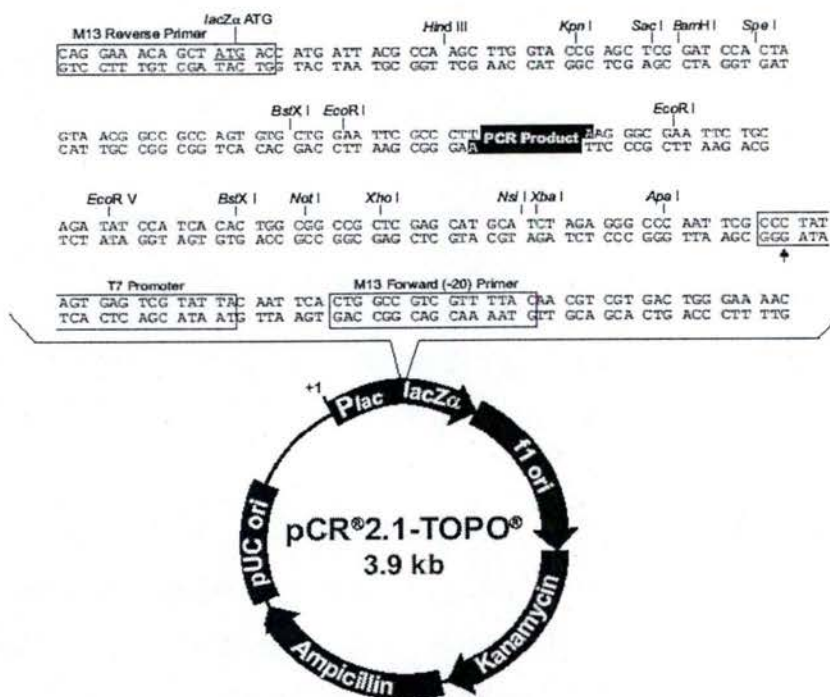
Compléter avec de l'eau distillée pour atteindre le volume final.

Ajouter finalement la T4 ADN ligase (Promega, Madison, USA), à raison de 1 à 3 U pour 1 volume final de réaction de 20 μ l.

Incuber le mélange de ligation 12 heures soit à 4°C soit à 16°C.



A



B

Figure II-11 :

A : Représentation de la Topoisomérase liée de manière covalente au plasmide PCR II-TOPO.

B : Carte génétique circulaire du vecteur pCR 2.1-TOPO.

II.12 Clonage TOPO TA

Kit TOPO TA cloning, (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), ce kit permet le clonage de fragments PCR terminés par un A en extrémité 3'OH dans le vecteur PCR 2,1 TOPO contenant des T libres en extrémité 5'P couplés à la tailing topoisomérase (**Figure II-11**).

II.12.1 Constituants du kit

Bactéries TOP10F', cette souche exprime *lacI^q*. Cela permet une sélection blanc/bleu en présence d'IPTG.

Milieu SOC : 2% Tryptone

0,5% Extrait de levure

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM Mg SO₄

20 mM glucose

Solution saline : NaCl 1,2 M

MgCl₂ 60 mM

Vecteur PCR 2,1-TOPO

II.12.2 Réalisation du « A-tailing »

Les produits PCR doivent se terminer par une extrémité A protrudante en 3'OH, pour cela, on réalise un « A tailing » afin d'ajouter un A en extrémité 3' des fragments PCR si une autre enzyme que la Taq polymérase a été utilisée pour la PCR.

Le mix contient :

- 7 µl de produit PCR,
- 1 µl de Taq polymérase,
- 1 µl de tampon 10 x,
- 1 µl de ddATP (2mM).

Mettre le mix à 72°C pendant 30 minutes.

II.12.3 Réalisation du TOPO TA cloning

Le mix contient :

- 2 µl de produit provenant du A-tailing,
- 1 µl de solution saline,
- 1 µl de vecteur TOPO (**Figure II-11**),
- 2 µl de dH₂O.

Incuber 5 minutes à température ambiante.

Prélever 2 µl de ce mix et le mettre sur 25 µl de bactéries hyper compétentes.

Incuber sur glace pendant 30 minutes.

Réaliser un choc thermique de 30 secondes à 42°C.

Ajouter 250 µl de milieu SOC.

Mettre 1 heure à 37°C sous agitation.

Etaler sur boîte de pétri LB + ampicilline + IPTG + x-gal.

II.13 Séquençage

La réaction de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence basé sur l'incorporation de nucléotides fluorescents par "PCR" (réaction d'élongation). Cette technique utilise le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing reaction kit (Perkin-Elmer, Branchburg, USA).

Un fragment à séquencer est incubé dans des conditions "PCR" en présence d'une seule amorce, ne permettant d'amplifier qu'un des deux brins. Le mélange PCR contient un ratio adéquat de nucléotides marqués par un agent fluorescent (1 type de fluorochrome par type de nucléotide) arrêtant l'élongation du brin et des nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction d'élongation produit une population d'amplicons de taille variable, terminés par un nucléotide couplé à un fluorochrome. Cette population d'amplicons est déposée sur un gel de

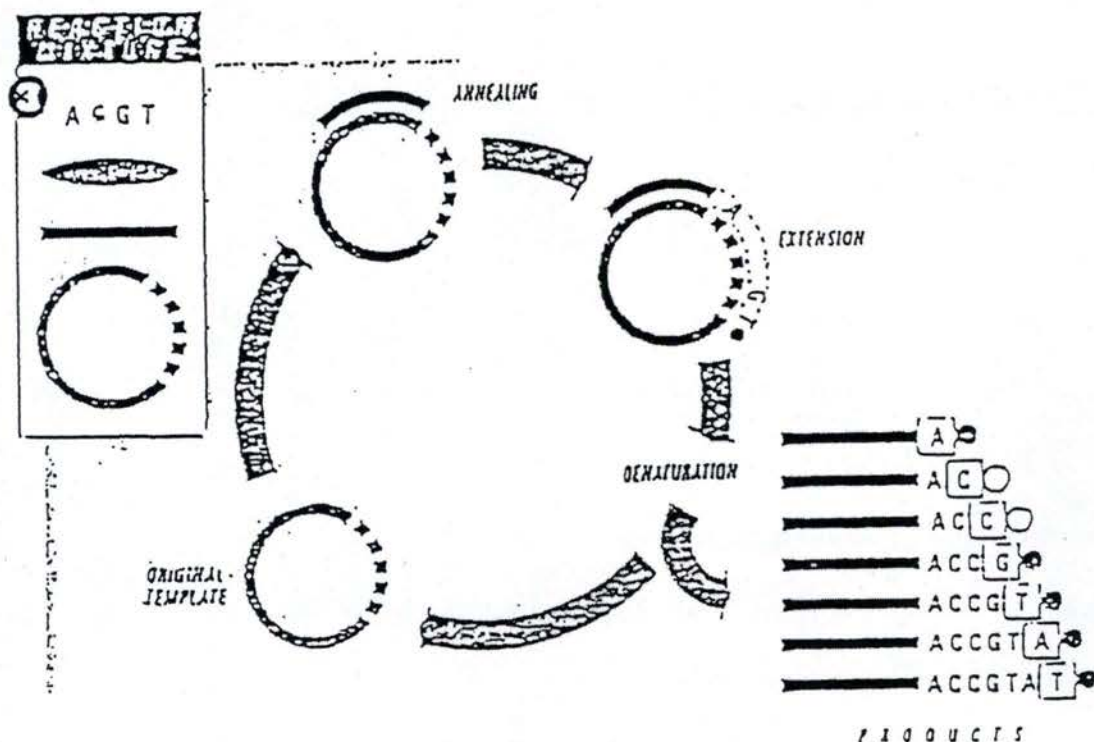


Figure II-12: PCR de séquençage à fluorescence.

Au cours des cycles PCR, l'élongation des fragments cibles est inhibée par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. On obtient des amplicons de taille différentes dont le dernier nucléotide incorporé est marqué. Après migration sur gel, la distribution de fluorescence est étudiée.

polyacrylamide résolutif à la base près. Les fragments migrent alors suivant leur taille. Sur le profil de migration, passe un laser d'une certaine longueur d'onde qui excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci émettent alors de la lumière sous une longueur d'onde qui leur est spécifique. La succession des quatre types de rayonnements émis est analysée, ce qui donne la séquence du fragment (**Figure II-12**).

II.13.1 Préparation du mix pour le séquençage

De 500 à 700 ng/μl du plasmide à séquencer.

7,5 pmoles d'amorces sens et anti-sens.

De l'H₂O distillée pour obtenir un volume final de 12 μl.

Afin de vérifier la présence de l'insert au sein des différentes constructions finales, diverses amorces ont été employées pour réaliser un séquençage complet, elles sont reprises à la **Figure II-13**.

II.14 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

(Griffin *et al.*, 1994)

Cette technique d'amplification enzymatique consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN (matrice) encadré de séquences connues. Ce procédé est rendu possible grâce à l'utilisation, d'une part, d'amorces oligonucléotidiques anticomplémentaires (c'est-à-dire de courts fragments d'ADN simple brin de séquence choisie et venant s'hybrider de part et d'autre de la séquence à amplifier) et, d'autre part, par l'emploi d'une ADN polymérase thermostable.

La PCR est réalisée par l'enchaînement de cycles successifs de dénaturation de l'ADN cible, hybridation des amorces, et polymérisation d'une molécule d'ADN complémentaire sur laquelle s'hybrident ces amorces. Chacun de ces cycles est dépendant de la température à laquelle est placé le mélange réactionnel, ce qui justifie l'utilisation d'une polymérase thermostable. La répétition de ces cycles permet l'amplification quasi exponentielle de la séquence d'ADN cible jusqu'à l'obtention d'un plateau suite à l'épuisement des réactifs. Théoriquement, à chaque cycle est produit un nombre de molécules égal au nombre présent au cycle précédent.

Séquençage	Nom	Amorces	[A/T - G/C]	Tm théorique
pLXSN	pLXSN Forw	CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC [1398 - 1420]	[9 - 14]	74°C
	pLXSN Rev	GAG CCT GGG GAC TTT CCA CAC CC [1537 - 1515]	[8 - 15]	76°C
pcDNA3.1	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG [863-882]	[12-8]	56°C
	BGH	CCT CGA CTG TGC CTT CTA [1091-1108]	[8-10]	56°C
Apo J	APO Int 1 F	TGC AAT GAG ACC ATG ATG GCC CT [304 -326]	[11 -12]	70°C
	APO Int 2 F	AGG ATA CCT ACC ACT ACC TGC CCT [602 - 625]	[11 -13]	74°C
	APO Int 3 R	AGC AGC TCG TTG TAT TTC CTG GTC A [1034 -1010]	[13 -12]	74°C

Figure II-13 : Amorces utilisées pour réaliser les différents séquençages lors de ce travail.

II.14.1 Clonage par PCR

Lors de ce travail, une partie des sous-clonages ont été réalisés par PCR. A partir du plasmide pBluescript, l'insert contenant l'apo J a été extrait par PCR à amorces flottantes. Les amorces flottantes contenant les sites de restriction d'intérêt permettent le clonage dans le vecteur pLXSN ou pcDNA3.1.A. Les différentes amorces utilisées pour réaliser l'ensemble des clonages sont reprises à la **Figure II-14**. Ces PCR ont été réalisées au moyen de l'enzyme Pfu, enzyme à haute fidélité.

II.14.2 PCR de criblage

Lors de ce travail un second type de PCR a été réalisé, les PCR de criblage. Pour ce type de PCR, le mix est réalisé en utilisant la Taq polymérase, et les colonies bactériennes positives sont directement piquées par un tips stérile et ajoutées au mix PCR.

II.14.3 Préparation du mélange réactionnel

- Amorces sens 10 pmoles
- Amorces anti-sens 10 pmoles
- dNTP (200 μ M final)
- Tampon de la polymérase concentré 10 X
- Matrice
- Pfu polymérase (Promega, Madison, U.S.A), 3 unités, ou la Taq polymérase (Roche, Mannheim, Allemagne), 2,5 unités
- Ajouter de l'eau stérile distillée pour atteindre le volume final désiré

En plus des tests d'amplification, un contrôle blanc est réalisé. Dans celui-ci, l'ADN est remplacé par de l'eau distillée, afin de détecter toute contamination éventuelle.

II.14.4 Programmation des cycles PCR

L'appareil utilisé est le Gene Amp PCR System 9.700.

Les réactions PCR utilisées pour ce travail se déroulent comme suit :

Clonage	Nom	Amorces	[A/T - G/C]	Tm théorique
pBSK > pLXSN	APO J PNF	<u>G GGT TAA CCC GCC ACC ATG ATG AAG ACT CTG CTG CTG TT</u> Hpa I Kozak Apo J (start)	[13 - 10]	66°C
	TRAPO J REV	<u>C GGG ATC CCG TCA CTC CTC CCG GTG CTT TTT GC</u> Bam HI Apo J (end)	[10 - 13]	72 °C
pBSK > pcDNA3.1	APO J 31 F	<u>CGC GGA TCC GCG GCC ACC ATG ATG AAG ACT CTG CTG CTG TT</u> Bam HI Kozak Apo J (start)	[13 - 10]	66°C
	APO J 31 R	<u>TGC TCT AGA GCC CTC CTC CCG GTG CTT TTT GCG</u> Xba I Apo J (end)	[8 - 13]	68 °C
pcDNA3.1>pLXSN	APO J PNF	<u>G GGT TAA CCC GCC ACC ATG ATG AAG ACT CTG CTG CTG TT</u> Hpa I Kozak Apo J (start)	[13 - 10]	66°C
	APO J PNR	<u>C GGG ATC CCG GCG GGT TTA AAC TCA ATG GTG</u> Bam HI His-Tag (end)	[11 -10]	62°C

Figure II-14 : Amorces utilisées pour les différents clonages par PCR

II.14.4.1 Premier type (Pfu polymérase)

Dénaturation : 2 min à 95°C

Cycles (35 cycles):

- Dénaturation 30 sec à 95°C.
- Hybridation 30 sec à 62°C.
- Élongation 4 min à 72°C.

Elle se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Les produits PCR sont conservés à 4°C.

II.14.4.2 Deuxième type (Taq polymérase)

PCR de criblage réalisée sur les différentes colonies

Dénaturation longue de 5 min à 94°C.

Série de cycles (40 cycles):

- dénaturation 30 sec à 94°C,
- hybridation 30 sec à 60°C,
- élongation 30 sec à 72°C.

Elle se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Les produits PCR sont conservés à 4°C.

II.14.5 Vérification du produit PCR

Le produit PCR est déposé sur un gel d'agarose afin de vérifier la taille du fragment amplifié par PCR.

II.15 Electrophorèse en gel d'agarose

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant appliqué sur un gel constitué de polymère d'agarose. Le pourcentage en agarose peut être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer (**Tableau II-1**). Des gels de haut pourcentage en agarose permettent de séparer des

Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

Tableau II-1: Concentration optimale en agarose à utiliser selon la taille des molécules d'ADN à séparer.

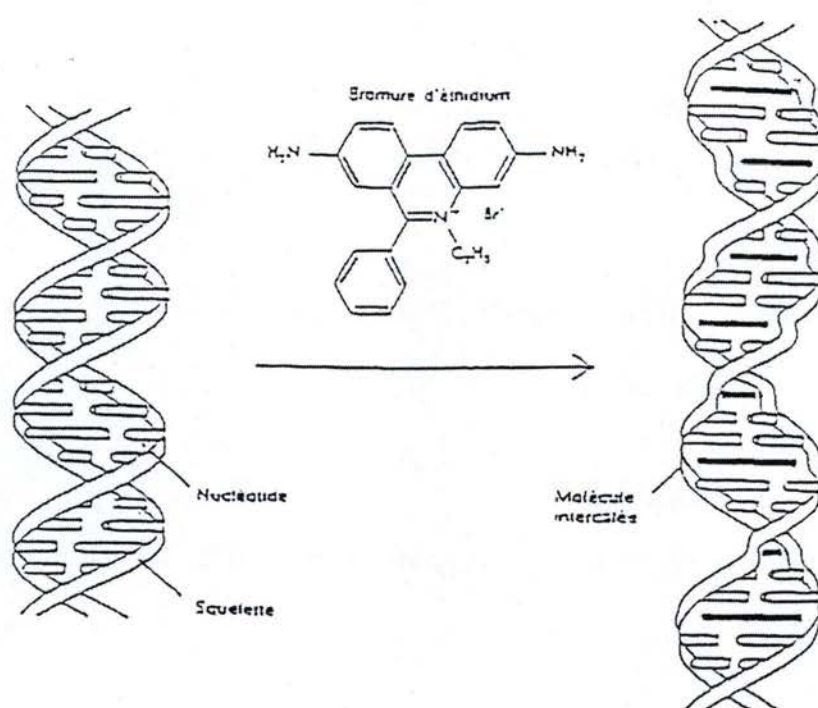


Figure II-15 : Structure et localisation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN (Watson *et al.*, 1989).

fragments d'ADN de petite taille et inversement. La taille des différents fragments d'ADN tests est estimée en faisant co-migrer des marqueurs de masse moléculaire. Ces marqueurs sont constitués d'ADN restreint par une enzyme de restriction générant des fragments d'ADN de taille connue. Pour visualiser les fragments dans le gel, on ajoute une solution de bromure d'éthidium, molécule qui est fluorescente quand elle s'intercale entre les bases appariées (**Figure II-15**). L'ADN ainsi marqué est visualisé sous illumination UV.

II.15.1 Matériel

Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)

Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)

Appareil photo : Kaiser RA1 + Photo-pront IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)

Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)

Lampe U.V. (Vilber-Lourmat, France)

TBE 1 X (Tris 1M, acide borique 0,9 M ; EDTA 0,01 M), stock TBE 10 x (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)

Bromure d'éthidium, solution stock de 500 µg/ml (Sigma, St Louis, USA)

Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA)

Tampon d'échantillon : Blue/Orange 6 x Loading Dye (Promega, Madison, U.S.A)

Marqueurs ADN de poids moléculaire utilisés (**Figure II-16**) :

- 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, USA) : fragments à 1.500, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, bp,
- 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) : fragments à 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp.

II.15.2 Méthode

Porter à ébullition un volume approprié d'un mélange contenant du TBE 1X additionné de 0,5 à 2 % d'agarose jusqu'à obtenir une solution limpide.

Ajouter le bromure d'éthidium à cette solution (dilution 5000 x).

Couler sur le support *ad hoc* muni de peigne(s) et laisser refroidir.

1 Kb DNA Mass ladder



100 pb DNA Mass Ladder

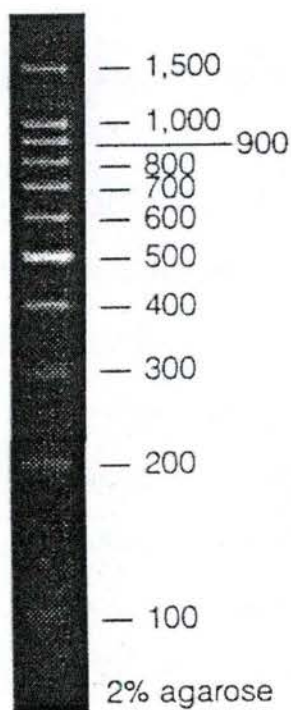


Figure II-16: Marqueurs de masse moléculaire utilisés lors de ce travail (Promega, Madison, USA).

Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X.

Déposer dans les puits du gel les échantillons auxquels on a préalablement ajouté le tampon d'échantillon.

Faire migrer à un voltage compris entre 80 V et 120 V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, alors que le bromure d'éthidium non lié, chargé positivement migre vers la cathode.

Arrêter l'électrophorèse et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination U.V.

II.16 Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT PCR)

Cette méthode nous a permis de pouvoir quantifier le niveau relatif d'ARNm de différents gènes dans nos conditions de stress.

II.16.1 Principe

La PCR normale permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN et ce spécifiquement grâce à un couple d'amorces encadrant exactement le fragment à amplifier. Dans le cadre de la Real Time PCR, la quantité d'amplicons produite est directement mesurable car elle est corrélée à une intensité de fluorescence. Au mix PCR de départ, une molécule intercalante est ajoutée (ici : du SYBR-Green). Cette molécule s'intercale entre les 2 brins d'ADN, de façon non spécifique, et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin présente. Cette méthode permet donc de suivre l'amplification au fur et à mesure des cycles PCR au sein même du tube PCR. La lecture de l'intensité de fluorescence est permise grâce au couplage d'un fluorimètre et d'un thermocycleur (ABI Prim 7000, Applied Biosystems, CA, USA) au sein de l'appareil PCR. Le signal fluorescent ne peut être détecté qu'à partir d'un certain seuil ensuite on observe une augmentation exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation. Le cycle correspondant au milieu de la phase exponentielle est appelé Ct (*threshold cycle*) (**Figure II-17**). Ce dernier est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible présent dans l'échantillon. L'évaluation de la quantité d'ADN se fait contre un standard. C'est à dire qu'on réalise l'amplification du gène d'intérêt ainsi que celle d'un gène de référence qui lui ne varie pas

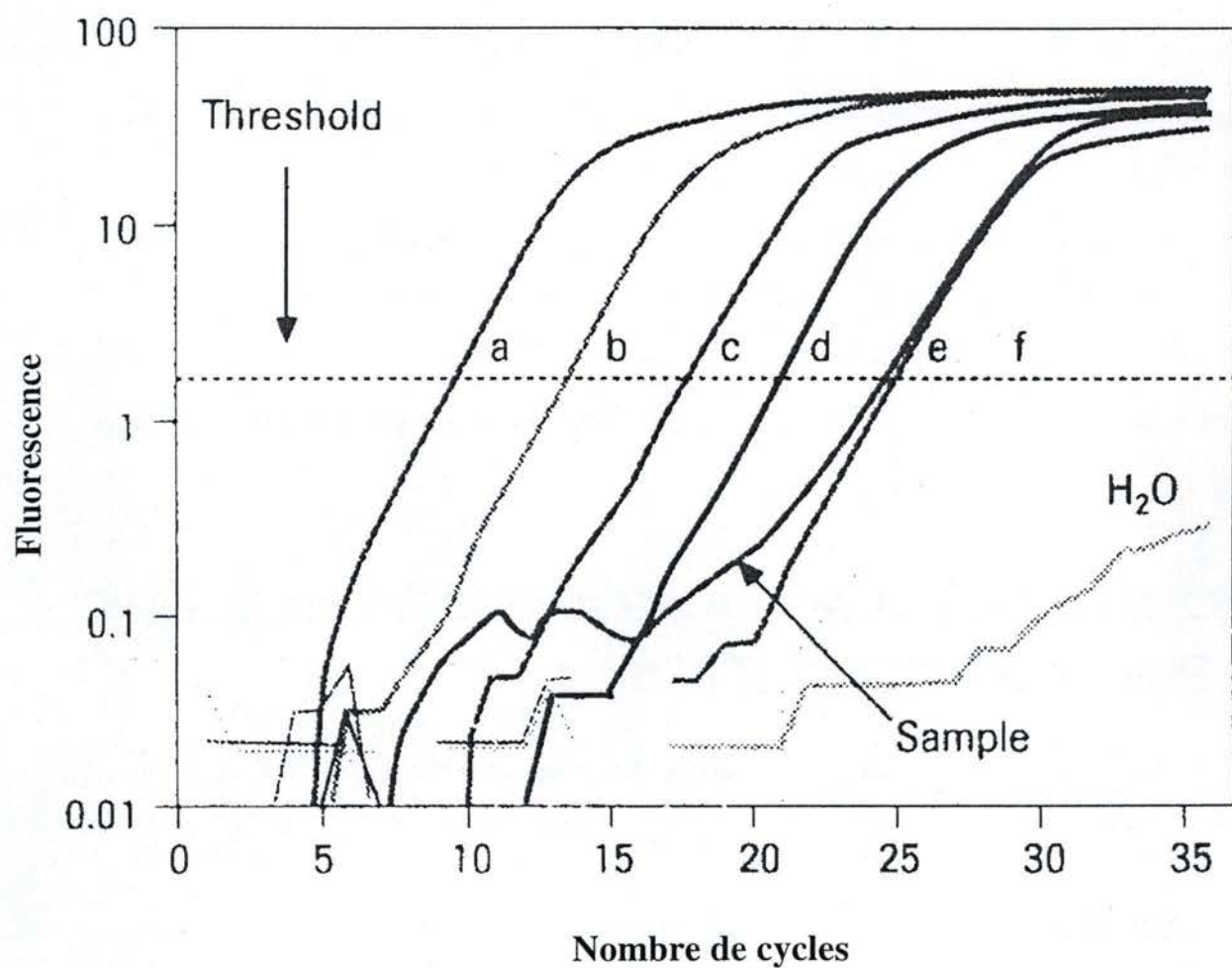


Figure II-17: Réalisation d'une Real Time PCR sur différentes concentrations d'ADN. Placement du threshold dans la zone linéaire d'amplification (Blaschke *et al.*, 2000).

dans les conditions étudiées. Un inconvénient de cette méthode est le risque d'amplification de produits parasites qui se fondent dans le signal fluorescent. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination lors de la PCR, une courbe de dissociation peut être réalisée en augmentant la température jusqu'à 95°C après la PCR, ce qui permet de déterminer les produits amplifiés sur base de leur température de melting (**Figure II-18**). D'autre part, on peut également déposer sur gel les produits PCR pour s'assurer que les produits amplifiés sont ceux attendus, ce qui permet de vérifier la taille du fragment.

Le protocole de cette technique comprend deux grandes étapes :

- la reverse transcription (RT) permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc : ne comprend que la séquence codante génomique) à partir d'extraits d'ARN totaux,
- la PCR proprement dite.

II.16.2 Méthode

II.16.2.1 Extraction de l'ARN des cellules

(RNAagents Total RNA Isolation System - Promega)

II.16.2.1.1 Matériel

Provenant du kit (Promega, Madison, U.S.A):

- solution de dénaturation,
- acétate de sodium 2M pH 4,0
- phénol/chloroforme/isoamyl alcohol (125 :24 :1) pH 4,7
- isopropanol,
- nuclease-free water.

A préparer :

- PBS,
- EtOH 75% (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- dH₂O.

II.16.2.1.2 Méthode

Décanner le milieu des cellules et les laisser sur glace.

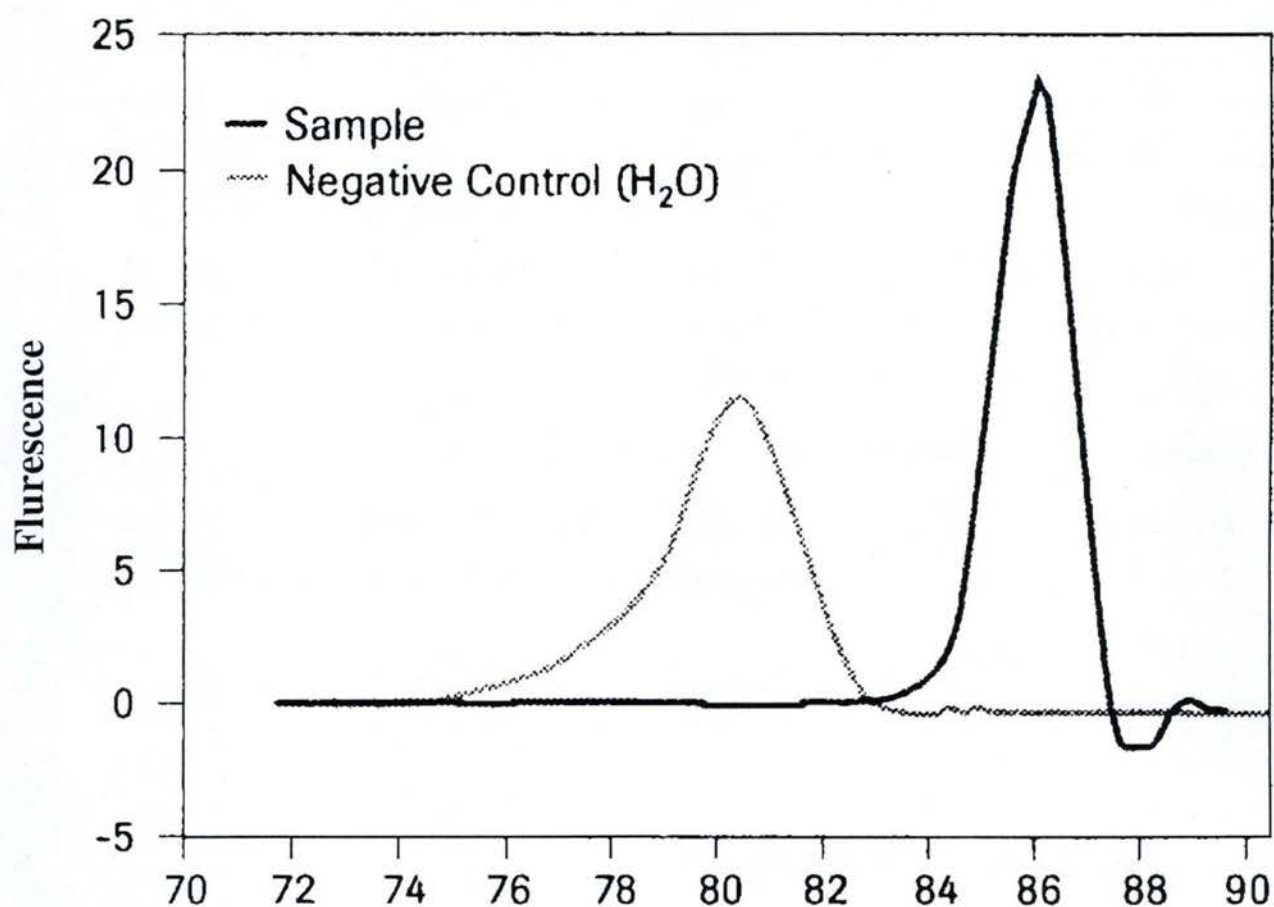


Figure II-18: Schématisation d'une courbe de dissociation des produits réalisée à la suite d'une Real Time PCR (Blaschke *et al.*, 2000).

Rincer 1x au PBS (*préalablement refroidi sur glace*).

Décanter complètement.

Ajouter 300 µl de solution de dénaturation et répartir cette solution sur toute la boîte en agitant doucement.

Racler la boîte et reverser le lysat dans un microtube.

Rem.: ce lysat se conserve à - 70°C.

Ajouter 30 µl d' Acetate de Sodium 2M (pH 4,0) et mélanger en inversant les tubes 4-5 fois.

Ajouter 300 µl de Phenol:chlorophorme:isoamyl alcohol (phase inférieure de la bouteille). Mélanger 4-5 fois par inversion et mélanger vigoureusement.

Laisser refroidir sur glace 15 minutes.

Centrifuger 20 minutes à 12 000 rpm à 4°C.

Récupérer délicatement la phase supérieure et la transférer dans un microtube propre.

Ajouter un volume égal d'isopropanol et incuber à - 20°C pendant +/- 30 minutes.

Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C.

Resuspendre le culot dans 500 µl de solution de dénaturation. Vortexer jusqu'à ce que l'ARN se dissolve (chauffer si nécessaire à 65°C).

Ajouter 500 µl d'isopropanol et mettre à -20°C pendant +/- 30 min.

Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C.

Laver le culot avec 1 ml d'EtOH 75% refroidi sur glace. Morceler le culot avec un tips stérile.

Centrifuger 10 minutes à 12 000 rpm.

Laisser sécher l'ARN puis le resuspendre dans 20 µl de dH₂O.

II.16.2.2 Réalisation de la transcription inverse

II.16.2.2.1 Matériel

- Oligo dT (500ng/µl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- ddH₂O Rnase free

- Tampon (5X) pour la Superscript RII Reverse Transcriptase. (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- RNAsin (40 U/μl) (Promega, Madison, U.S.A.)
- dNTP mix 250 μM (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- SuperScriptII (200U/l) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
- RNase H (2U/μl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)

II.16.2.2.2 Méthode

Mélanger l'ARN à l'oligo dT et spinner (le total du mix doit faire 9,5μl) :

- 2μl oligo dT (500ng/μl),
- x μl RNA (pour avoir 2 μg, en fonction du dosage),
- x μl ddH₂O Rnase free.

Incuber 10 minutes à 70°C et spinner.

Mettre immédiatement sur glace, incuber 5 minutes et réaliser un quickspin.

Réalisation du mix de réaction :

- 4 μl buffer RT,
- 2 μl DTT 0,1 M,
- 1 μl RNAsin (40 U/μl),
- 2 μl dNTP mix.

Ajouter 9 μl de réaction mix et spinner.

Incuber 5 minutes à température ambiante.

Ajouter 1,5 μl SuperScriptII (200U/l).

Incuber 1h30 à 42°C et spinner.

Incuber 15 minutes à 70°C et spinner.

Ajouter 1 μl de RNase H (2U/μl) et spinner.

Incuber 20 minutes à 37°C et spinner.

Gène	Position (pb)	séquence	taille amplicon
23 kDa HBP	407 - 431 517 - 540	5'-gcc tac aag aaa gtt tgc cta tct g-3' 5'-tga gct gtt tct tct tcc ggt agt-3'	134 pb
Apolipoproteine J	937 - 959 1032 -1050	5'-gga tga agg acc agt gtg aca ag-3' 5'-cag cga cct gga ggg att c-3'	114 pb
Osteonectine	868 - 889 957 - 982	5'-gag acc tgt gac ctg gac aat g-3' 5'-gga agg agt gga ttt aga tca caa ga-3'	115 pb
Fibronectine	5023 - 5041 5111 - 5131	5'-tgt ggt tgc ctt gca cga t-3' 5'-gct tgt ggg tgt gac ctg agt-3'	109 pb
SM 22	511 - 530 586 - 606	5'-cgt gga gat ccc aac tgg tt-3' 5'-aag gcc aat gac atg ctt tcc-3'	96 pb

Figure II-19 : Amorces utilisées en Real Time PCR lors de ce travail.

Congeler à -20°C .

II.16.2.3 Recherche de couples d'amorces appropriées

Le programme *Primers express* (Applied Biosystem, Pays-Bas) permet de choisir des couples d'amorces répondant à différentes contraintes. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb afin d'obtenir une amplification optimale, celle des amorces varie entre 15 et 30 pb et leur contenu en C/G doit représenter 20 à 70% de la séquence nucléotidique. Les amorces ne peuvent contenir au maximum que 2 G et/ou C parmi les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3' afin de minimiser l'hybridation entre eux. De plus la température de melting des 2 amorces doit se situer entre 58 et 60°C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2°C entre les 2 amorces. Les différentes amorces employées lors de ce travail sont illustrées à la **Figure II-19**.

II.16.2.4 Détermination de la concentration en amorces

Les amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt sont tout d'abord testées dans 3 concentrations différentes (50 nM, 300 nM, 900 nM) afin de déterminer la concentration pour laquelle l'amplification des amorces est optimale (Ct faible) et où l'amplification des NTC (*No Template Control*) est minimum (Ct élevé).

Les différentes concentrations en amorces sont mélangées au mix PCR constitué de SYBR Green PCR Master Mix (2x, Applied Biosystems, Pays-Bas) avec 5 µl d'H₂O pour les NTC ou 5 µl d'ADNc pour les tests, ceci afin d'atteindre un volume d'échantillon de 25 µl.

II.16.2.5 Détermination de la courbe de dilution de l'ADN

Une fois la concentration optimale en amorces définie, on procède à différentes dilutions d'ADNc. On remarquera que le Ct est inversement proportionnel à la dilution réalisée (**Figure II-17**). Ces différentes dilutions permettront de déterminer l'efficacité de la PCR en réalisant une courbe de régression dont la pente renseigne sur l'efficacité. Pour pouvoir quantifier un gène contre un standard il faut que leurs efficacités soient semblables.

II.16.2.6 Quantification de l'expression des gènes

Chaque mix contient :

- amorce sens dont la quantité varie en fonction des mises au point réalisées au point II.1.1.4,
- amorce anti-sens dont la quantité varie en fonction des mises au point réalisées au point II.1.1.4,
- SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Pays-Bas),
- ADN ou dH₂O (dans les blancs).

Le mix atteint un volume de 25 µl. Le mélange est ensuite placé dans l'appareil Real Time et l'amplification est réalisée durant 40 cycles.

II.16.2.7 Cycles Real Time PCR

Dénaturation de 5 min à 95°C.

Série de cycles (variables 40 ou 50 cycles) :

- dénaturation 15 sec à 94°C,
- hybridation-élongation 1 minute à 65°C.

Les produits PCR sont conservés à 4°C.

II.16.2.8 Analyse des résultats

Il faut tout d'abord déterminer le Ct par l'ajustement subjectif du seuil de détection dans la zone linéaire d'amplification. Ensuite, le ΔCt de chaque gène pour chaque condition est évalué ($\Delta Ct = Ct$ du gène d'intérêt – Ct du gène de référence), suivi du calcul de leur $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ du gène d'intérêt – ΔCt du gène présent dans les cellules contrôles). On détermine enfin la quantité relative d'expression du gène étudié dans les différentes conditions en utilisant la formule $Qr = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Une quantité relative de 1 signifie que le gène cible ne montre aucune variation d'expression.

II.17 Purification d'ADN

II.17.1 A partir de gel d'agarose

Un fragment d'ADN séparé par électrophorèse en gel d'agarose peut être extrait de ce gel et purifié par élimination de l'agarose, des sels et du bromure d'éthidium.

II.17.1.1 Matériel

(Kit « QIAquick gel extraction » (Qiagen, Hilden, Allemagne))

- Tampon QG (Tampon de dissolution)
- Isopropanol
- Tampon PE (Tampon de lavage)
- Tampon EB (Tampon d'élution)
- Colonnes

II.17.1.2 Méthode

Exciser le fragment d'ADN du gel d'agarose avec une lame de scalpel propre.

Peser la bande gel dans un microtube. Ajouter 3 volumes de tampon QG pour un volume de gel (100 mg équivaut à 100 µl).

Incuber à 50°C pendant 10 minutes et pour la dissolution du gel, vortexer les tubes toutes les 2-3 minutes durant l'incubation.

Ajouter ensuite un volume de gel (du départ) d'isopropanol dans le mix.

Placer un « spin colonne QIAquick » sur un microtube de 2 ml.

Déposer le mix sur la colonne et centrifuger pendant 1 minute (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne).

Éliminer l'éluat.

Ajouter sur la colonne 500 µl de tampon QG et centrifuger pendant 1 minute (cette étape permet d'éliminer toute trace d'agarose).

Pour laver, mettre sur la colonne 750 µl de tampon PE et centrifuger pendant 1 minute.

Éliminer l'éluat et centrifuger de nouveau 1 minute à 10 000 rpm.

Placer la colonne sur un microtube de 1,5 ml propre.

Pour éluer l'ADN, ajouter 50 µl de tampon EB ou 50 µl d'eau distillée et ensuite centrifuger à vitesse maximum. L'éluat contient cette fois l'ADN.

Doser ensuite l'ADN contenu dans l'éluat.

Résultats

III RESULTATS

Lors de ce mémoire nous avons étudié un nouveau modèle de sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) aux ultraviolets de type B (U.V.B).

Nous avons étudié trois biomarqueurs principaux de la sénescence suite à ces stress : l'activité enzymatique SA β -gal, l'incorporation de thymidine dans l'ADN, et le niveau relatif d'ARNm de certains gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence (apo J, ostéonectine, SM22, fibronectine). Etant donné que le niveau d'expression de l'apo J augmentait suite à ces stress, en plus de l'intérêt de l'étude de ce gène connu pour avoir une fonction "chaperone-like", nous avons décidé d'étudier la surexpression de ce gène. Nous avons réalisé ceci en étudiant par western blot son niveau d'expression protéique après les stress, puis, nous avons entrepris la réalisation de divers clonages afin d'effectuer différentes transfections transitoires et stables et d'étudier les effets de la surexpression de ce gène sur la résistance à divers stress cytotoxiques.

III.1 Etude de biomarqueurs de la sénescence après des stress subcytotoxiques et répétés aux U.V.B.

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié l'apparition de biomarqueurs de la sénescence prématurée induite par des stress subcytotoxiques et répétés aux U.V.B. Pour cela, nous avons effectué 2 stress par jour à 250 mJ/cm^2 pendant cinq jours consécutifs, suivi d'une période de repos de deux jours, ceci afin de discriminer la réponse à court terme et à long terme aux stress. Nous avons toujours réalisé 2 contrôles, les cellules "jour zéro" (J0) représentant l'état des cellules avant réalisation des stress et les cellules "contrôles" (CTL) ayant subi les mêmes conditions de culture que les cellules stressées, en n'ayant jamais été exposées aux U.V.B. Ces cellules ainsi que les cellules stressées sont issues d'une même culture et sont au même passage en culture. Les conditions exactes de stress sont reprises dans la partie "matériels et méthodes".

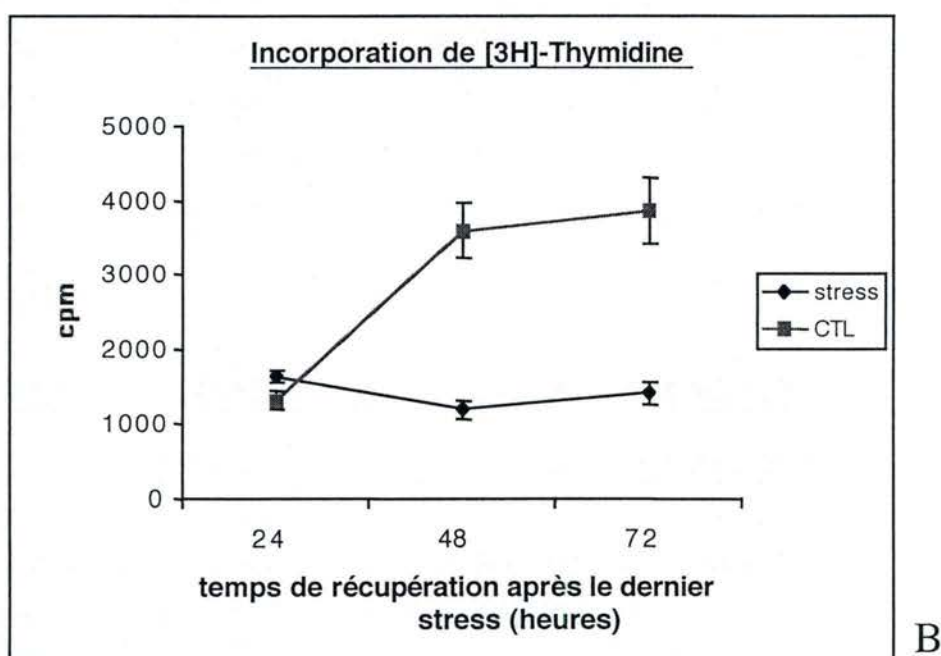
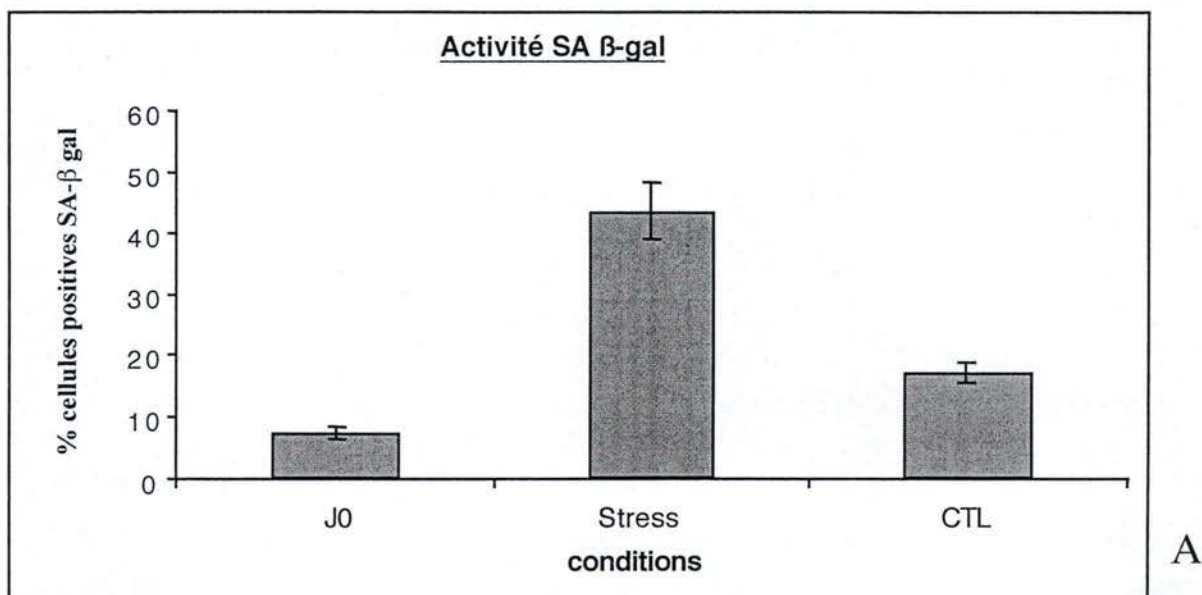


Figure III-1 : A : Pourcentage de cellules présentant l'activité SA- β gal suite à des stress subcytotoxiques répétés aux U.V.B à une dose de 250mJ/cm² x stress sur des fibroblastes FS, à raison de 2 stress par jour pendant 5 jours.

(J0 = cellules jour zéro, CTL = cellules contrôles, Stress = cellules stressées aux U.V.B.).

B : Incorporation de [3H]-thymidine au cours du temps après les stress chez des fibroblastes FS ayant subi des stress subcytotoxiques répétés aux U.V.B à une dose de 250mJ/cm² x stress à raison de 2 stress par jour pendant 5 jours. (CTL = cellules contrôles, Stress = cellules stressées aux U.V.B.).

III.1.1 Activité SA- β gal (Senescence Associated β -galactosidase)

Nous avons étudié l'effet de stress répétés aux U.V.B. sur la proportion de fibroblastes positifs pour l'activité SA- β gal. Cette activité enzymatique, découverte par (Dimri *et al.*, 1995), est détectable à pH 6,0 chez les cellules sénescents. Nous constatons que la proportion de cellules positives augmente de l'ordre de 2,5 fois entre les cellules "CTL" et les cellules "stress" (à 250 mJ/cm² d'U.V.B/stress, à raison de 2 stress par jour pendant 5 jours) (Figure III-1A).

III.1.2 Incorporation de [3H]-thymidine

Nous avons aussi étudié l'impact de stress répétés aux U.V.B sur le niveau d'incorporation de [3H]-thymidine dans les cellules. Divers temps de récupération après le dernier stress ont été réalisés, ceci afin de mettre en évidence la capacité de récupération des cellules. Nous constatons que les cellules contrôles récupèrent un bon potentiel prolifératif après 48 heures de récupération, par opposition aux cellules qui ont subi des stress et qui restent à un faible niveau d'incorporation de la [3H]-thymidine (Figure III-1B).

III.1.3 Etude du niveau relatif de transcrits de gènes associés à la sénescence par Real Time PCR

Plusieurs gènes sont connus pour être surexprimés dans les cellules sénescents. Parmi ceux-ci on retrouve les gènes de l'apolipoprotéine J, de l'ostéonectine, de la fibronectine et de SM22 (Gonos *et al.*, 1998).

Nous avons voulu savoir si ces gènes étaient également surexprimés dans notre modèle de SIPS aux U.V.B. Dans ce but, nous avons étudié le niveau relatif d'ARNm de ces gènes par Real Time PCR en prenant comme référence le niveau de transcrit du gène 23 kDa HBP qui ne varie pas dans nos conditions expérimentales.

Plusieurs mises au point sont nécessaires lors de l'étude du niveau relatif de transcrit d'un gène donné par Real Time PCR.

Des amorces spécifiques sont préalablement choisies en utilisant le logiciel "primer express", dont l'utilisation est conseillée par le fabricant de l'appareil Real Time PCR, générant des amplicons de 50 à 150 paires de bases. Ensuite, il faut mettre au point la concentration en amorces sens et anti-sens afin de trouver des concentrations optimales pour chacune des 2 amorces. Ceci est obtenu en réalisant les 9 combinaisons possibles en amorces sens et anti-

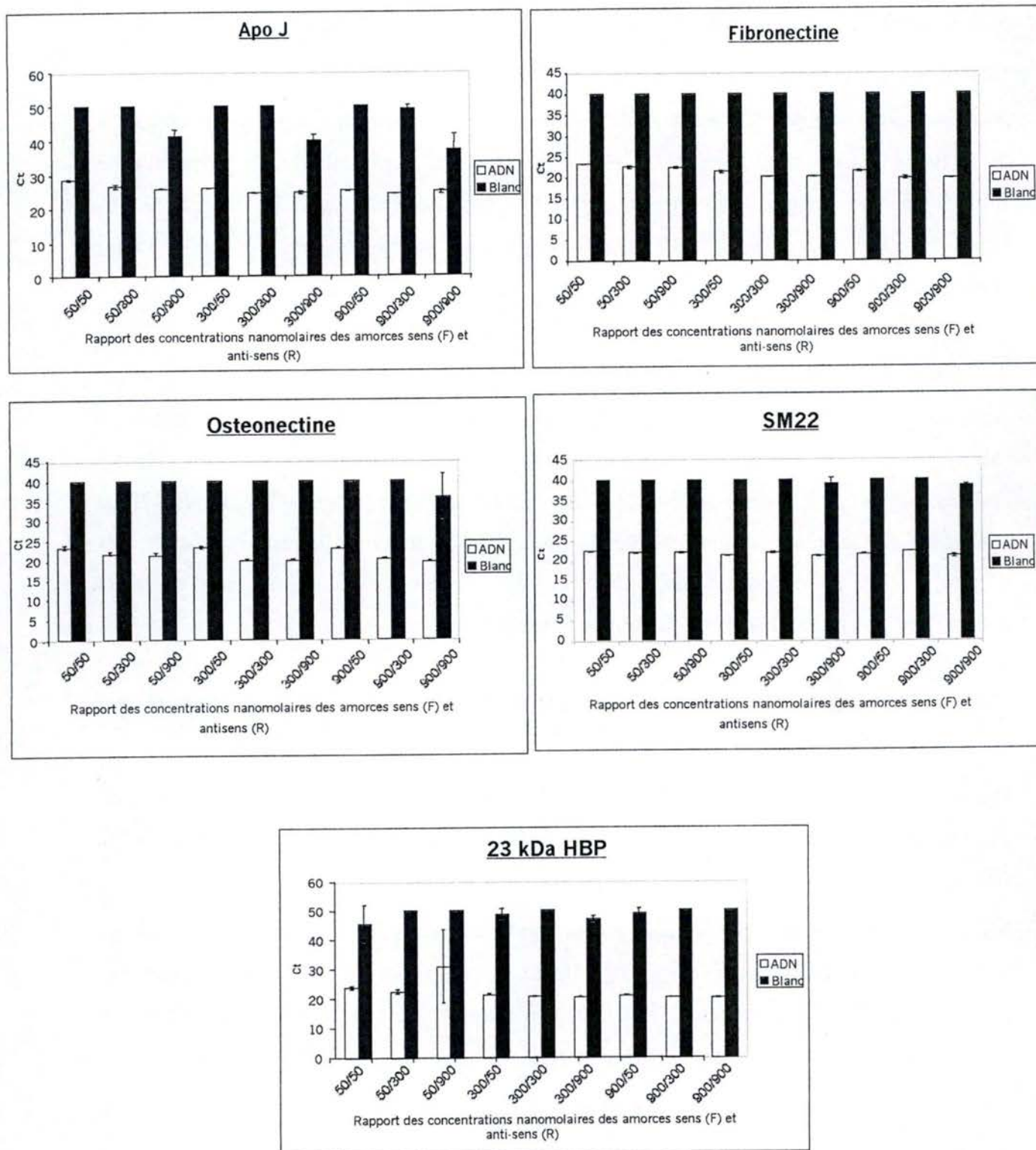


Figure III-2: Ct en fonction du rapport des différentes concentrations nanomolaires en amorces sens et antisens à utiliser pour les différents gènes étudiés. Les séquences des amorces sont données dans la section matériels et méthodes.

sens en partant des concentrations de base de 50, 300 et 900 nM. Une Real Time PCR est alors réalisée et les concentrations en amorces optimales sont celles qui donnent un C_t ("threshold cycle" = cycle correspondant à la fluorescence émise à la moitié de la zone exponentielle d'amplification du gène) élevé pour les blancs (=aucune amplification) et un C_t faible pour les échantillons (=amplification optimale).

La **Figure III-2** reprend les résultats obtenus pour cette mise au point de la concentration en amorces pour les différents gènes testés. Suivant les résultats obtenus, voici les concentrations en amorces choisies pour les gènes étudiés:

	Amorce sens	Amorce anti-sens
23 kDa HBP	300 nM	300 nM
Apolipoprotéine J	300 nM	50 nM
Ostéonectine	300 nM	300 nM
Fibronectine	900 nM	900 nM
SM22	300 nM	50 nM

Outre l'étude des courbes de dissociations réalisées après la PCR, une vérification sur gel d'agarose du produit PCR obtenu en utilisant ces concentrations en amorces est réalisée afin de s'assurer que nous obtenons bien un amplicon de la taille attendue (**Figure III-3**). Les résultats obtenus correspondent à la taille attendue des amplicons pour chaque gène d'intérêt (cfr section matériels et méthodes). Nous n'obtenons aucune amplification dans les blancs.

La dernière étape de ces mises au point correspond à la comparaison des efficacités de PCR obtenues pour chaque gène d'intérêt avec le gène de référence afin de permettre la quantification du niveau relatif d'ARNm du gène d'intérêt. Pour ce faire, on effectue pour chaque gène une PCR à partir de dilutions sériées en ADN_c. Les dilutions utilisées sont : 1x ($\approx 0,5 \mu\text{g}$ d'ARN avant la RT), 10x, 100x, 1000x, et 10 000x. On obtient alors des valeurs en C_t pour chacune des dilutions. On calcule ensuite les différences de C_t (ΔC_t) obtenues pour chaque dilution entre le gène d'intérêt et le gène de référence, ici 23 kDa HBP. Ceci permet de comparer les efficacités de PCR en traçant une droite montrant l'évolution de ce ΔC_t en fonction des concentrations en ADN_c. La **Figure III-4** reprend les droites des ΔC_t obtenus entre les différents gènes d'intérêt et le gène de référence. Chacune des droites possède une

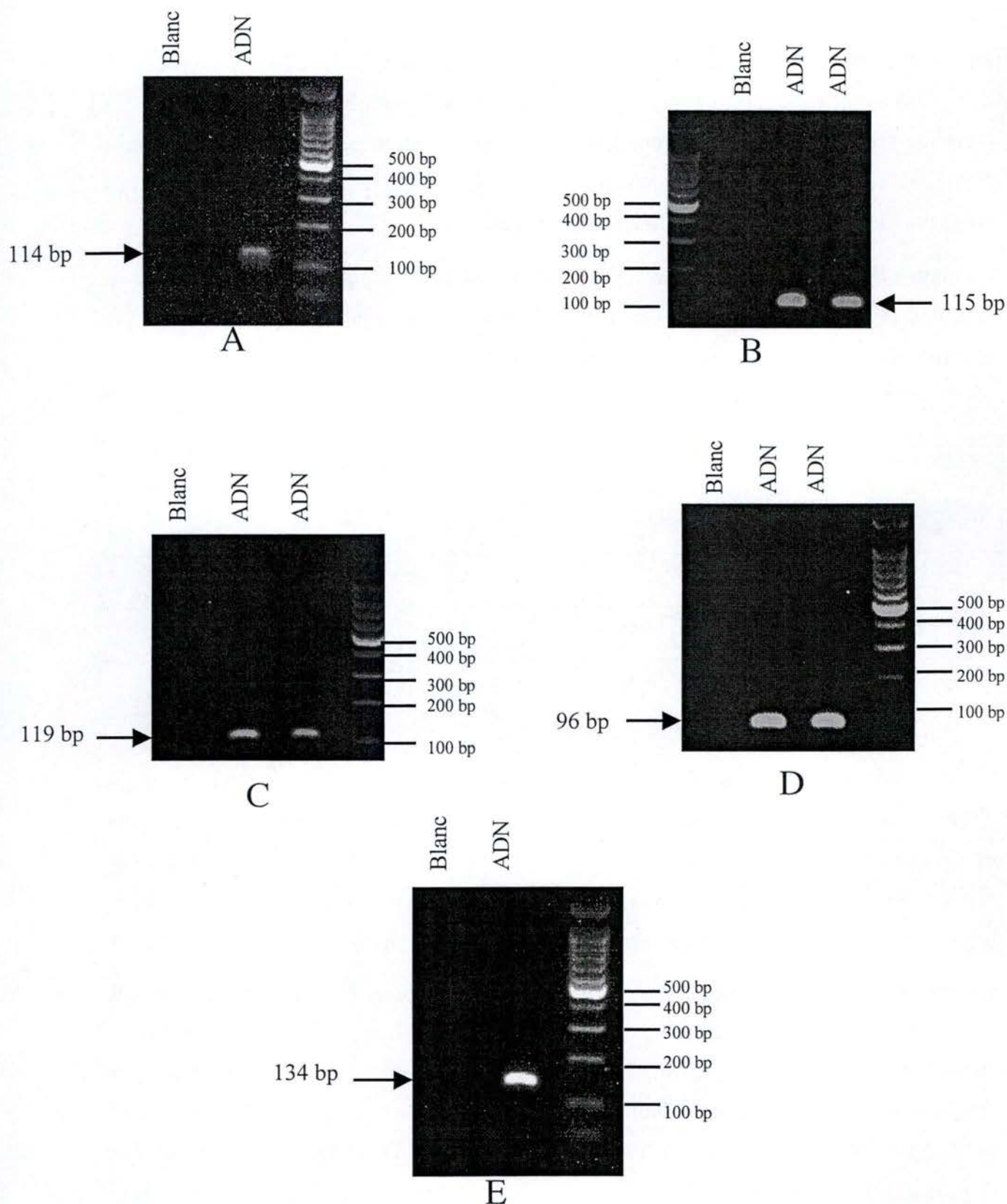


Figure III-3: Vérification sur gel d'agarose de la spécificité des amorces utilisées lors de la Real Time PCR de l'apolipoprotéine J (A), l'ostéonectine (B), la fibronectine (C), SM22 (D) et 23 kDa HBP (E). (Marqueur de poids moléculaire = 100pb DNA mass ladder)

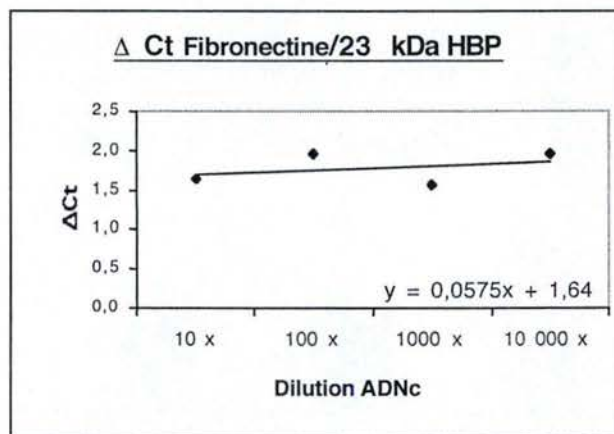
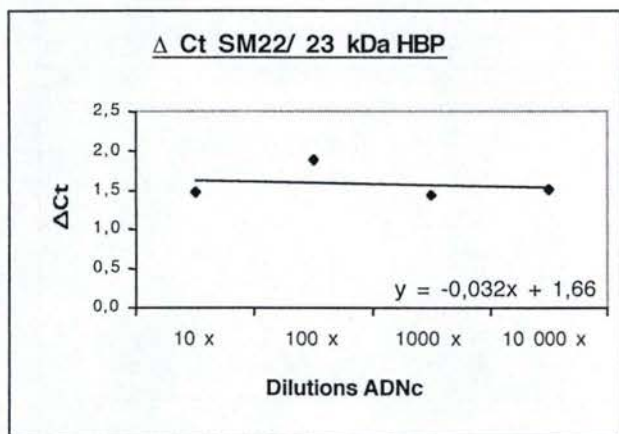
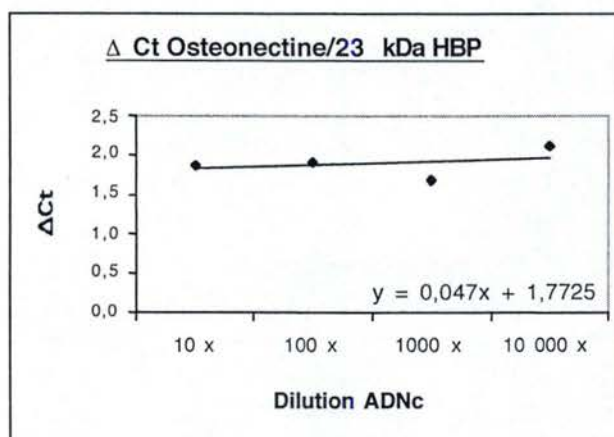
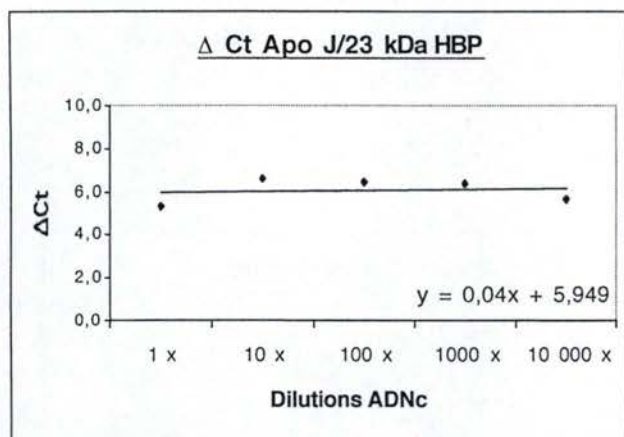


Figure III-4: Courbes standards donnant l'évolution des ΔC_t en fonction des dilutions d'ADN_c utilisées (1x, 10x, 100x, 1000x, 10 000x).

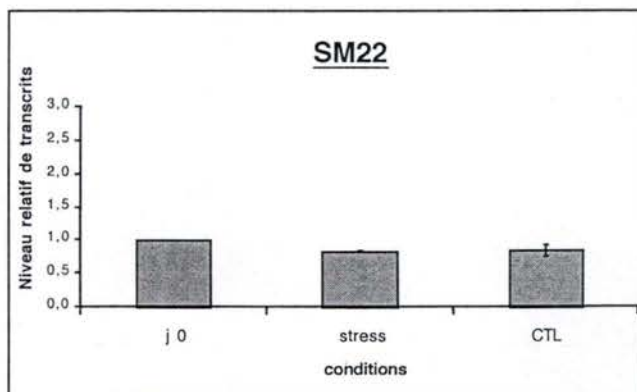
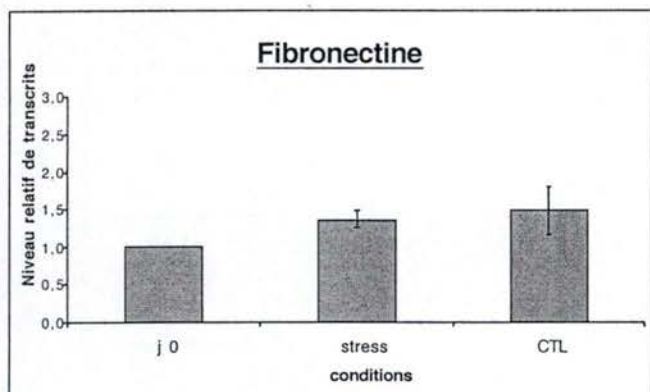
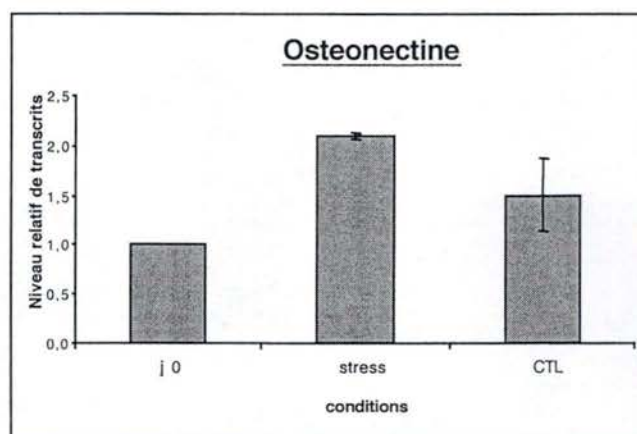
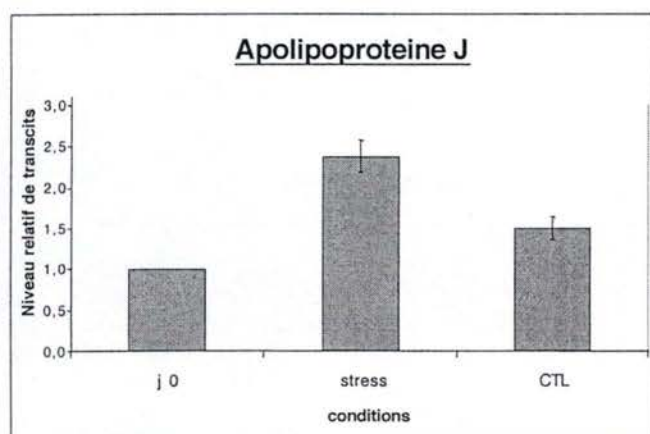


Figure III-5 : Niveaux relatifs de transcrits obtenus pour les différents gènes d'intérêt suite à 10 stress subcytotoxiques aux U.V.B. à une dose de $250\text{mJ}/\text{cm}^2$ x stress (J0 = cellules jour zéro, CTL = cellules contrôles, Stress = cellules stressées aux U.V.B).

pente inférieure à 0,1, ce qui constitue le seuil à ne pas dépasser (cfr manuel d'utilisation : Real Time PCR, Applied Biosystems). Dès lors, nous pouvons comparer le niveau de transcrit de tous nos gènes d'intérêt à celui du gène 23 kDa HBP.

Les résultats de l'étude du niveau relatif de transcrits des 4 gènes sont repris à la **Figure III-5**. On voit donc que nous obtenons suite aux stress subcytotoxiques aux U.V.B une surexpression du niveau de transcrits de l'apo J de l'ordre de 1,7x (entre les cellules stress et les cellules CTL) et du niveau de transcrits de l'ostéonectine de l'ordre de 1.4 x (entre les cellules stress et les cellules CTL). Aucune modification du niveau relatif de transcrits n'a pu être mise en évidence pour la fibronectine et SM22 par rapport aux cellules CTL.

III.1.4 Etude du niveau protéique de l'apo J lors de la SIPS induite par les U.V.B.

Etant donné que l'apo J est décrite dans la littérature pour avoir une fonction protectrice contre de nombreux stress, nous avons étudié son expression au niveau protéique lors de la SIPS induite par les U.V.B. Pour cela, nous avons réalisé des western blot à partir de protéines issues de lysats cellulaires ainsi que de milieux dans lequel baignent les cellules stressées et contrôles (surnageants), 72 heures après le dernier stress.

L'anticorps primaire que nous avons utilisé lors de cette étude est un anticorps polyclonal de chèvre reconnaissant la partie carboxy-terminale de la chaîne β de l'apo J (Santa Cruz). Les résultats ont été normalisés avec ceux obtenus pour la tubuline, notre protéine de référence.

Nous observons une augmentation du niveau protéique d'apo J de l'ordre de 1.5 x dans les lysats et une augmentation de l'ordre de 6.8 x dans les surnageants des cellules stressées par rapport aux cellules contrôles (**Figures III-6 et III-7**). Le niveau plus élevé d'ARNm de l'apo J après stress sous U.V.B s'accompagne donc d'une surexpression au niveau protéique, sous sa forme intracellulaire et surtout sous sa forme sécrétée.

L'apo J est en général présentée comme une protéine capable de protéger les cellules contre une variété de stress. Nous avons donc voulu tester si l'apo J pouvait avoir un effet protecteur contre les stress U.V.B à doses cytotoxiques dans nos conditions expérimentales.

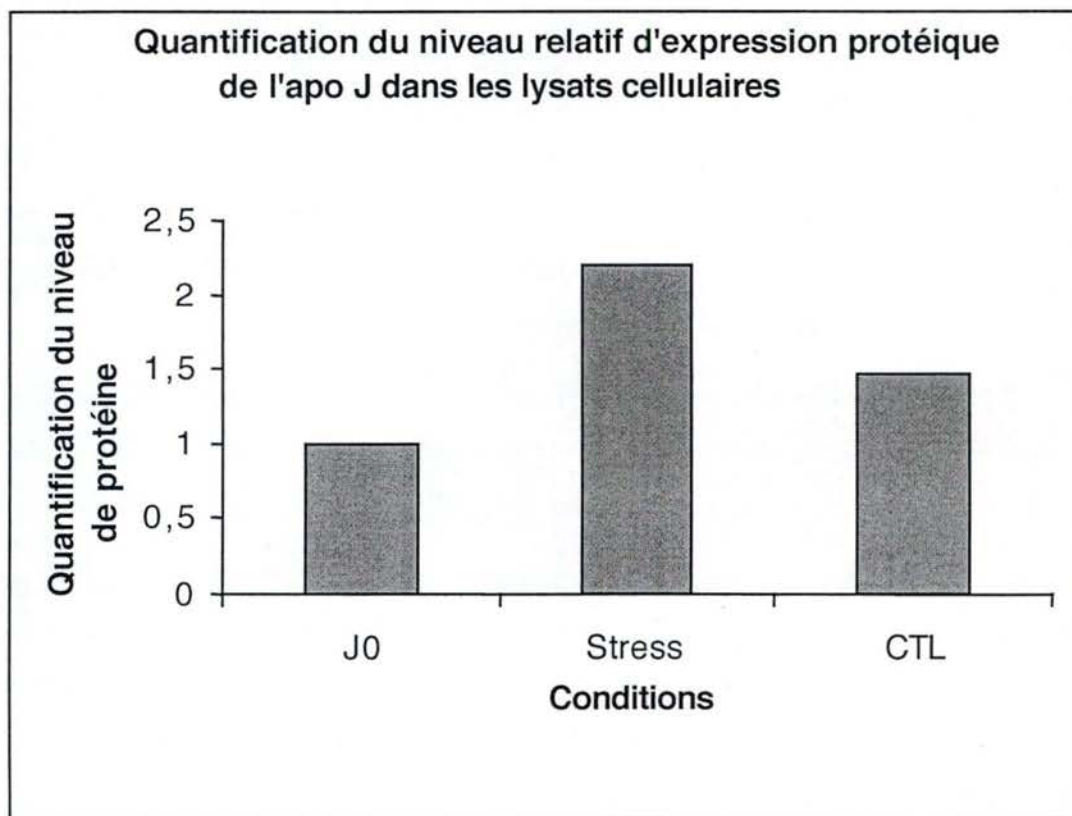
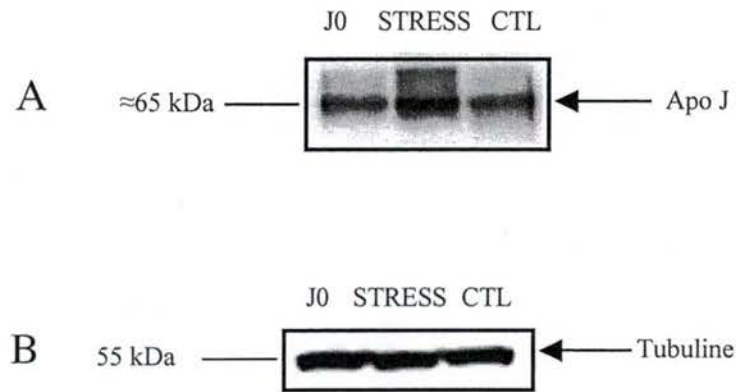
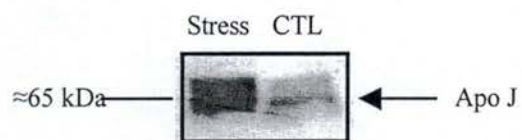
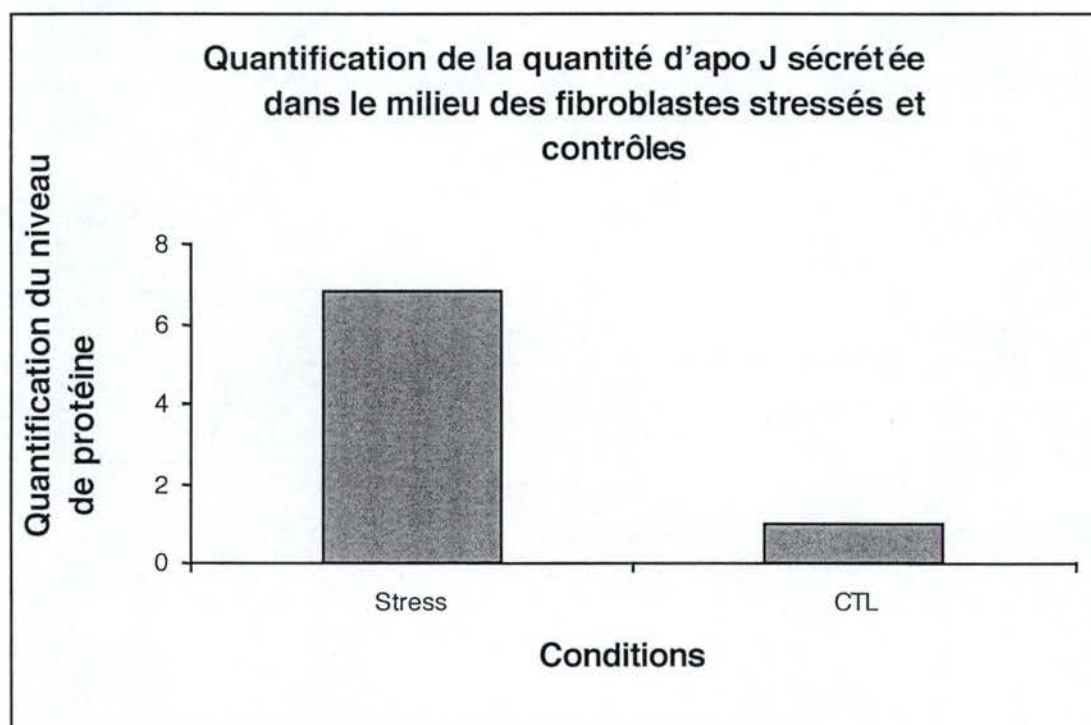


Figure III-6 : Western blot réalisé sur les fibroblastes FS ayant subi 10 stress aux U.V.B. (J0 = cellules « jour zéro », CTL = cellules contrôles, Stress = cellules stressées aux U.V.B).
A : Apolipoprotéine J dans les lysats de fibroblastes.
B : Contrôle tubuline réalisé sur les lysats cellulaires.
C : Quantification du niveau relatif d'expression de l'apo J.



A



B

Figure III-7 : A : Western blot réalisé sur les fibroblastes FS ayant subi 10 stress aux U.V.B. (CTL = cellules contrôles, Stress = cellules stressées aux U.V.B).

B : Quantification du niveau relatif d'expression de l'apo J.

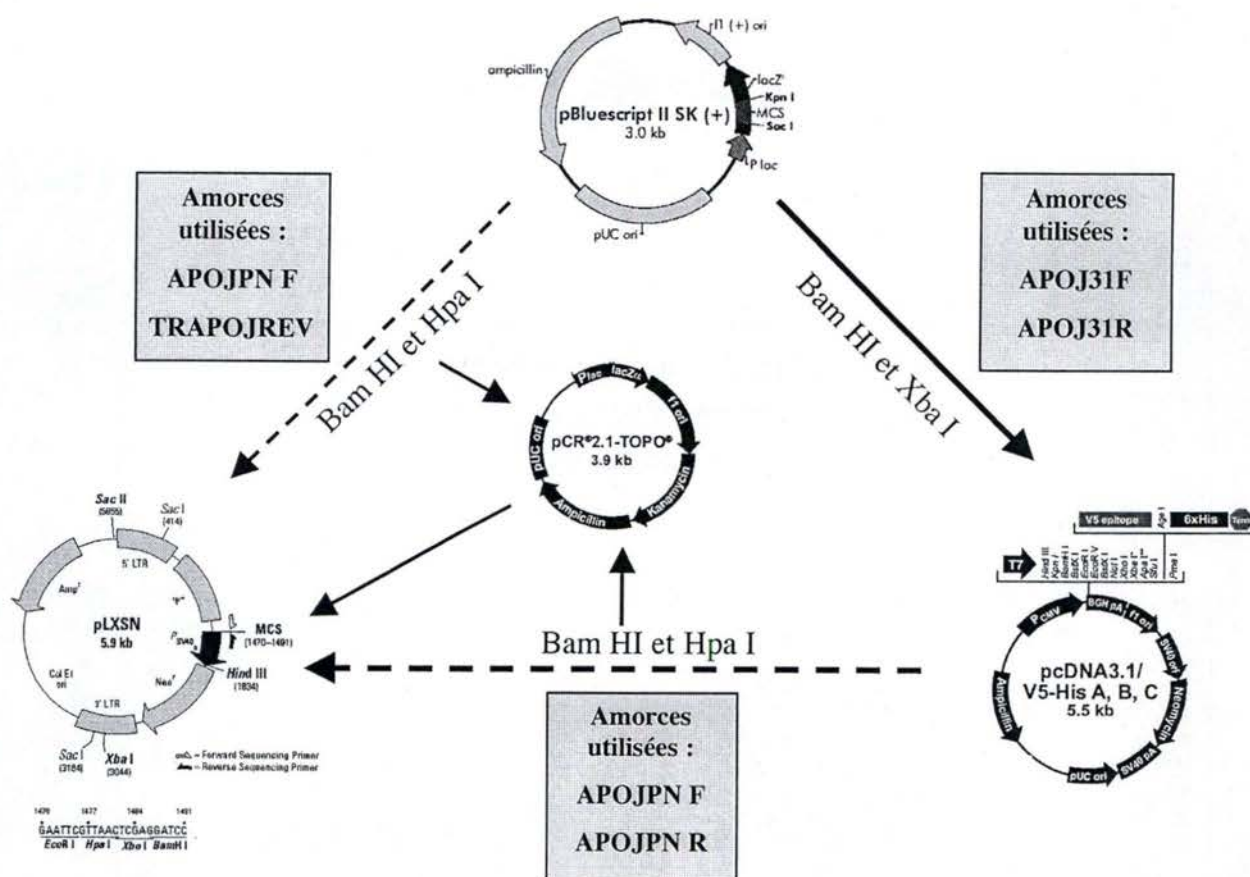


Figure III-8 : Schéma illustrant les différents sous-clonages réalisés lors de ce travail.

III.2 Rôle de la surexpression de l'apo J humaine en SIPS induite par U.V.B.

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons entrepris l'étude du rôle de la surexpression de l'apo J dans une lignée de fibroblastes de peau (FS) transfectés de façon stable avec l'ADN_c de l'apo J.

Dans ce but, nous sommes partis d'un plasmide pBluescript contenant la séquence complète de l'ADN_c de l'apo J humaine (banque RZPD). Nous avons entrepris de sous-cloner l'ADN_c de l'apo J directement dans le vecteur rétroviral pLXSN. D'autre part, nous avons également décidé de sous-cloner la séquence de l'apo J dans un autre plasmide, le plasmide pcDNA3.1.A, permettant d'ajouter un « tag » 6-His/ V5 à l'apo J. Enfin, un troisième sous-clonage de l'apo J portant ce « tag » sera réalisé de nouveau dans le vecteur pLXSN. (Figure III-8).

Afin de mener à bien ces différents sous-clonages, nous avons effectué des PCR en utilisant des amorces à "bouts flottants", sur lesquelles nous insérons les sites de restriction adéquats pour le sous-clonage souhaité.

III.2.1 Clonage de l'apo J humaine dans le vecteur pLXSN

Afin de sous-cloner l'apo J humaine dans le pLXSN, nous avons effectué une PCR avec des amorces à "bouts flottants" contenant les sites de restrictions pour les enzymes BamHI et HpaI (Figure III-9)

Une purification sur gel des produits PCR a ensuite été réalisée en utilisant le kit QIAquick. Puis, ce produit purifié a été restreint par les enzymes de restriction BamHI et HpaI et lié avec le vecteur pLXSN également restreint par ces deux enzymes.

Aucune colonie ne s'est révélée posséder l'insert après plusieurs tentatives de ligation et de transformation. Nous avons soupçonné un problème résultant de la restriction sur les produits PCR seuls. Dès lors, nous avons décidé de sous-cloner notre produit PCR résultant de la PCR à amorces à bouts flottants dans le vecteur PCR 2.1-TOPO afin de pouvoir réaliser cette restriction pour dégager l'insert cloné dans ce plasmide. Nous avons obtenu plusieurs colonies possédant l'insert cloné dans le vecteur PCR 2.1-TOPO. L'insert a été récupéré par restriction aux sites BamHI et HpaI. Après purification, nous avons pu réaliser une ligation de l'insert avec le vecteur pLXSN restreint. Nous avons obtenu 11 colonies positives après

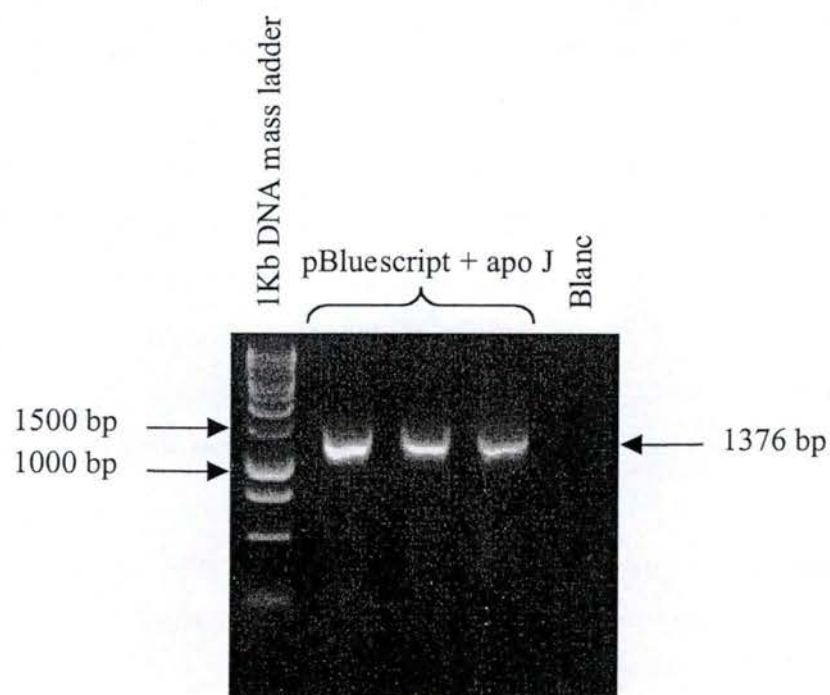


Figure III-9: Produits de PCR résultant de la PCR à amorces à « bouts flottants » contenant les sites BamHI et HpaI afin de permettre le sous-clonage de l'apo J dans le vecteur pLXSN. La bande obtenue est à la taille attendue (1376 bp).

une PCR de criblage sur les 23 colonies ayant poussé après la transformation, avec les amorces à "bouts flottants" TRAPOJ REV et APOJ PNF (**Figure III-10**). Nous avons ensuite restreint par les enzymes BamHI / HpaI les produits mini-preps issus des 11 colonies positives. Nous avons obtenu une bande de la taille attendue pour 3 colonies (5, 12 et 23) (**Figure III-11**). Un séquençage a dès lors été effectué et les 3 colonies se sont révélées posséder la séquence correcte et complète de l'apo J (cfr. séquençage colonie 5 en annexe).

III.2.2 Clonage de l'apo J humaine dans le vecteur pCDNA3.1.A His/V5

III.2.2.1 Clonage dans le vecteur pCDNA3.1.A His/V5

Afin de pouvoir discriminer la protéine endogène de la protéine transfectée, nous avons décidé de réaliser un sous-clonage supplémentaire dans le plasmide pcDNA3.1.A 6-His/V5. Ceci devait nous permettre de greffer un double « tag » constitué de 6-histidines (6-His) suivi d'un épitope V5.

Pour cela, nous avons réalisé une nouvelle PCR à amorces à bouts flottants pourvues cette fois des sites de restriction pour les enzymes BamHI et XbaI. L'amorce anti-sens est évidemment dépourvue du codon stop de l'apo J afin de permettre le greffage du tag. Nous avons également choisi le plasmide pcDNA3.1.A pourvu de la phase de lecture correcte.

Nous obtenons sur gel le produit de la PCR à amorces à bouts flottants APOJ31F et APOJ31R à la taille attendue (**Figure III-12**). Une purification de ce produit PCR a été réalisée en utilisant le kit QIAquick. Ce produit PCR a été restreint par les enzymes de restriction BamHI et XbaI. Une ligation a été effectuée avec le plasmide pcDNA3.1.A restreint également par les enzymes BamHI et XbaI.

Une PCR de criblage a ensuite été réalisée sur les colonies qui avaient été sélectionnées après transformation avec le produit de ligation. Six colonies testées montrent un produit de PCR de la taille attendue (**Figure III-13**). La présence de l'insert a de nouveau été confirmée par une restriction avec les enzymes BamHI et XbaI dans ces 6 colonies (**Figure III-14**).

Un séquençage complet des colonies 22, 28 et 33 a confirmé la présence de la séquence de l'apo J complète, correcte et en phase avec les tags (cfr. séquençage colonie 28 en annexe).

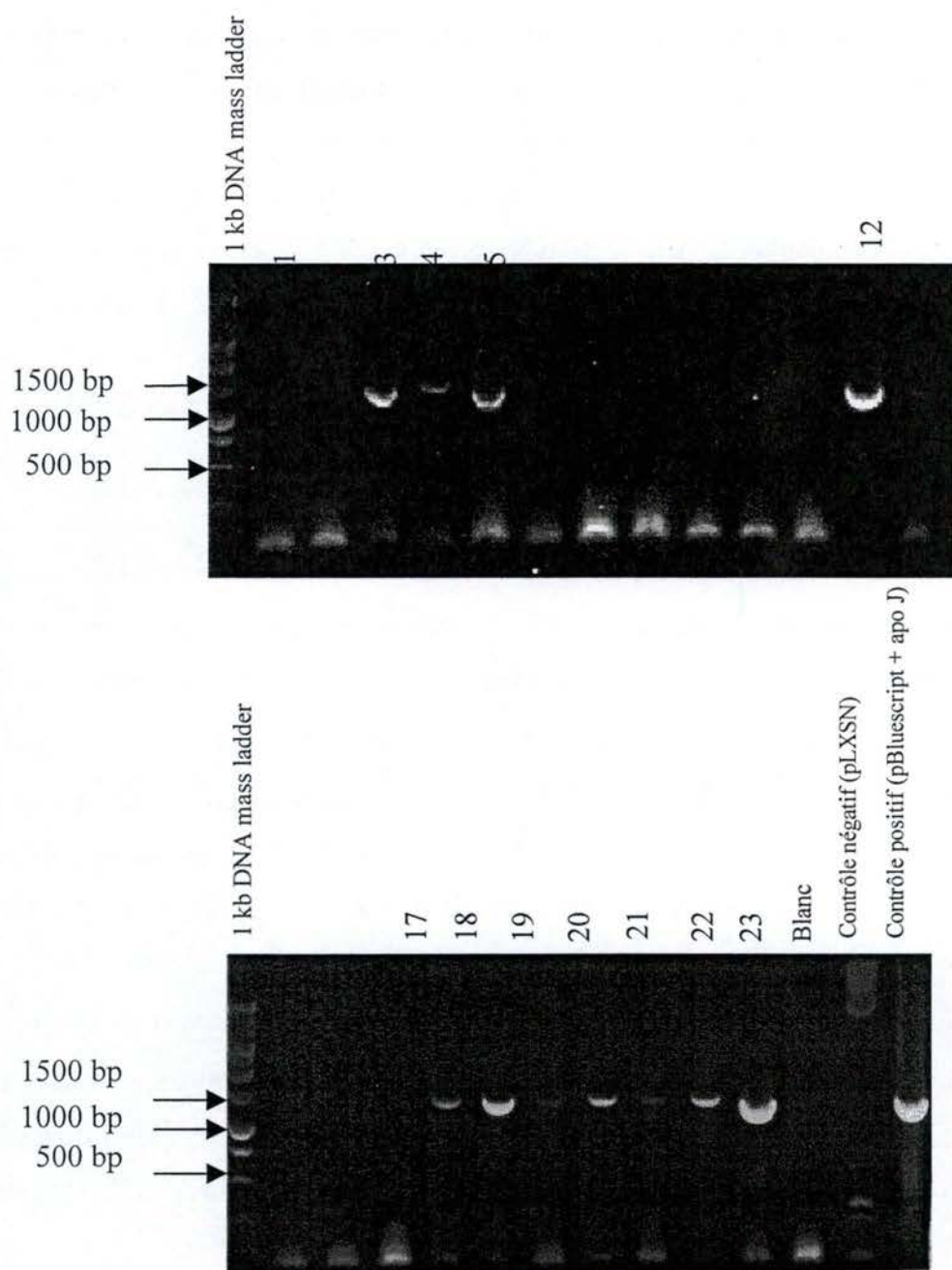


Figure III-10: PCR de criblage réalisée sur les clones positifs suite à la transformation dans *E.Coli* du produit de ligation pLXSN + apo J.

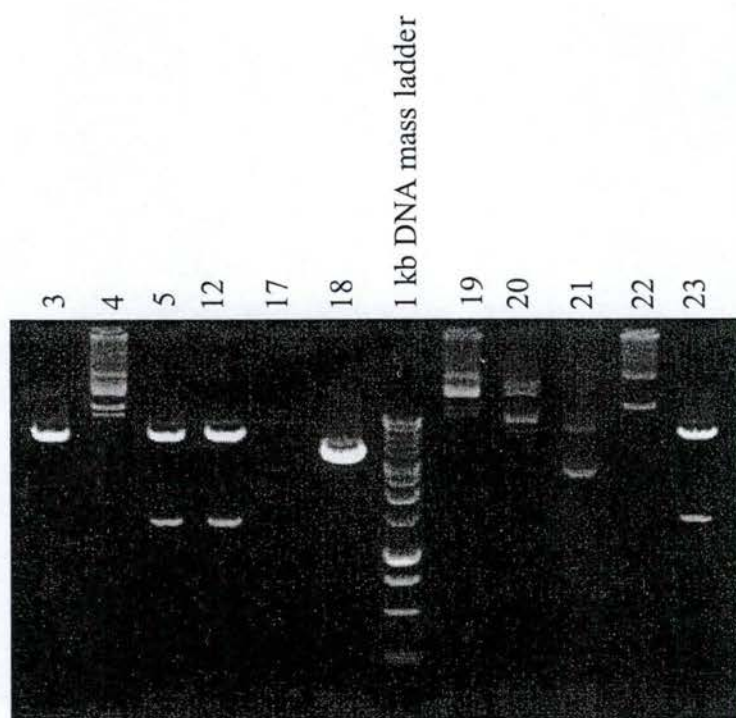


Figure III-11: Restriction avec les enzymes BamHI et HpaI sur les produits obtenus après minis-préparations d'ADN plasmidiques. Trois colonies (5, 12 et 23) montrent un profil de restriction attendu.

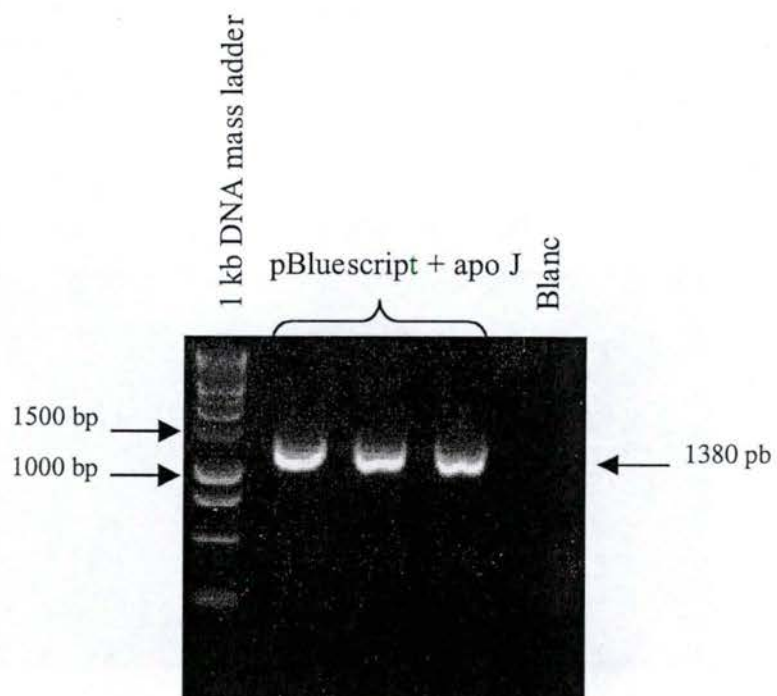


Figure III-12: Amplicons obtenus après PCR à amorces flottantes, APOJ31F et APOJ31R, afin de cloner la séquence de l'apo J dans le plasmide pcDNA3.1.A. La bande obtenue est à la taille attendue.

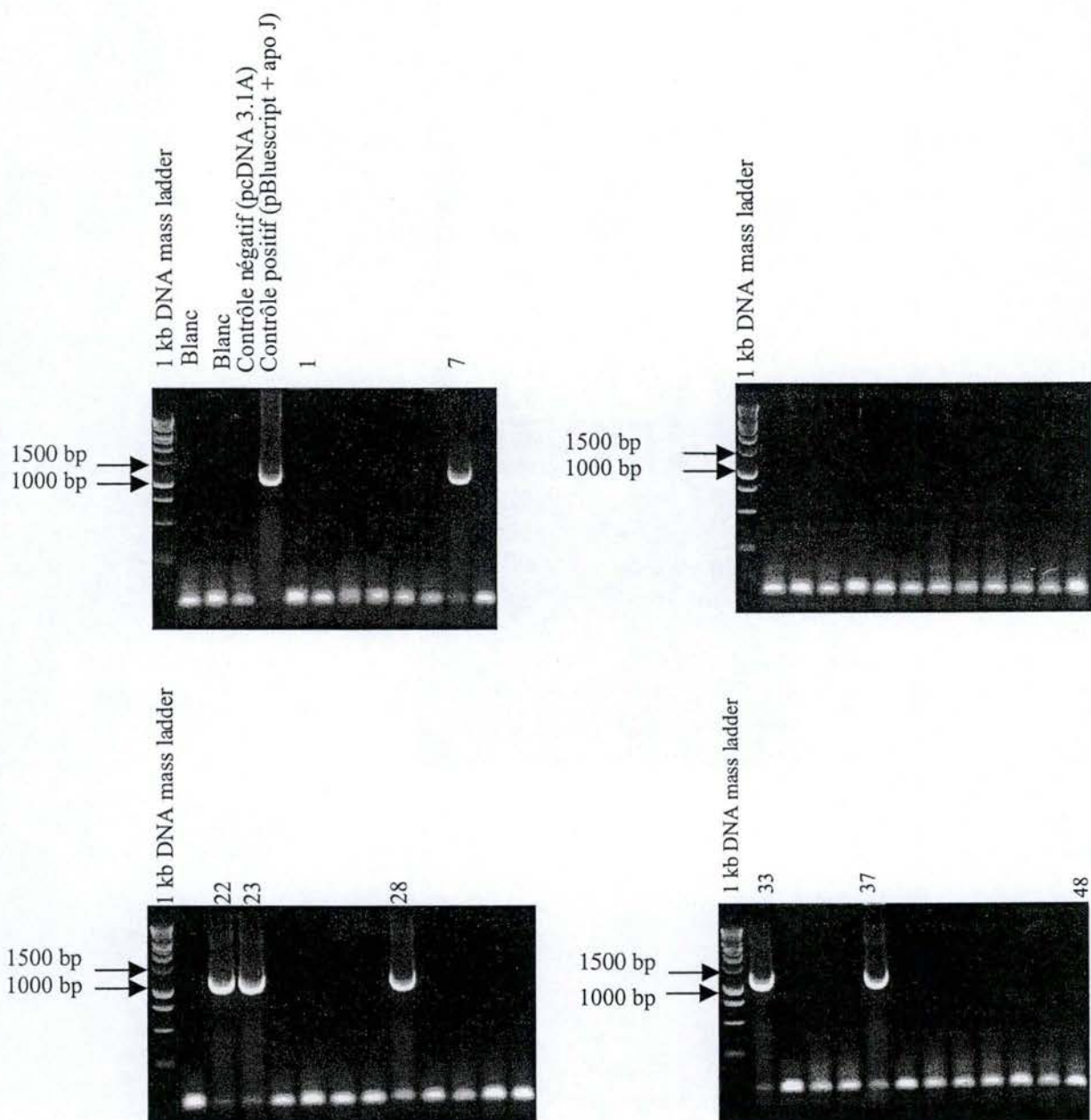


Figure III-13: PCR de criblage sur les colonies positives après ligation du vecteur pcDNA3.1.A et de son insert. Six colonies semblent effectivement posséder l'insert.

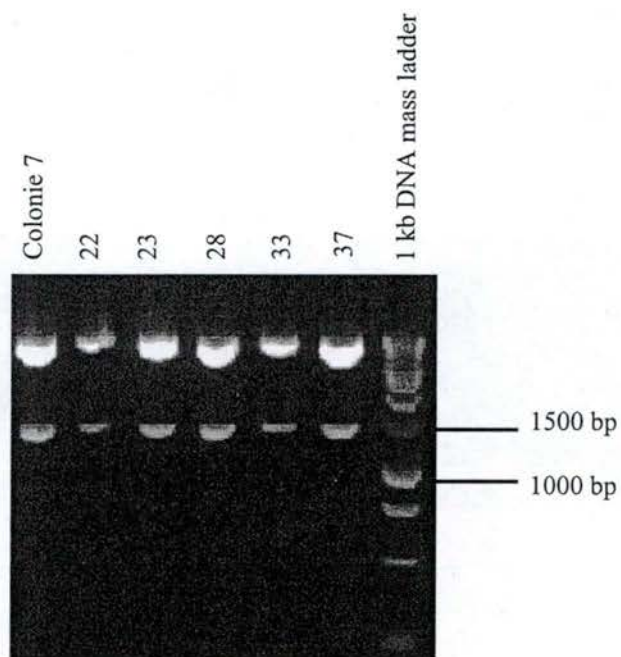


Figure III-14: Produits de la restriction avec les enzymes BamHI et XbaI sur les produits obtenus après mini-préparations d'ADN plasmidiques. Les 6 colonies montrent le profil de restriction attendu.

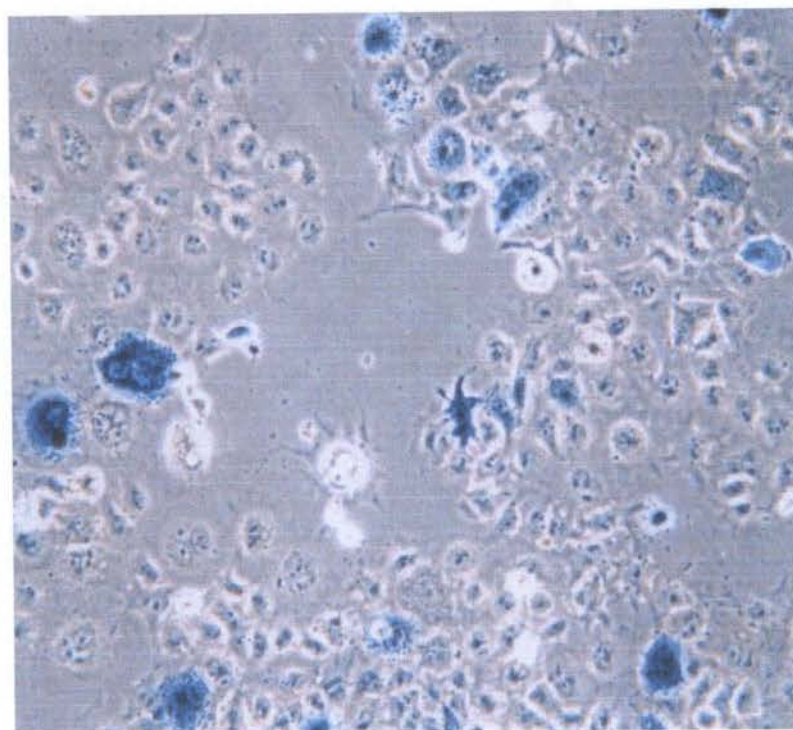


Figure III-15: Coloration des cellules COS ayant été transfectées avec le vecteur pcDNA3.1.A + LacZ. Les cellules bleues sont les cellules ayant incorporé le vecteur.

III.2.2.2 Transfection transitoire dans les cellules COS.

A cette étape, nous avons décidé de réaliser une transfection transitoire dans les cellules COS ainsi qu'une transfection stable dans les fibroblastes SV-40 afin d'une part, de mettre en évidence que la protéine portant le « tag » était bien surexprimée et sécrétée par les cellules COS, et d'autre part, de réaliser une expérience de cytotoxicité par U.V.B, EtOH et t-BHP avec les fibroblastes SV-40.

Nous avons donc tout d'abord entrepris une transfection transitoire dans les cellules COS en utilisant l'agent transfectant superfect. Ceci afin de vérifier si la protéine apo J taggée était bien exprimée dans les cellules et sécrétée dans le surnageant. Ceci devait montrer que le double tag ne gêne ni l'expression ni la dimérisation de la protéine.

Nous avons réalisé la transfection sur des cellules à 70% de confluence. Différentes transfections ont été effectuées avec :

- le plasmide pcDNA3.1.A seul,
- le plasmide pcDNA3.1.A + apo J (issu des colonies 7, 28 et 33),
- le plasmide contrôle pcDNA3.1.A + LacZ.

Après 48 heures, les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3.1.A + LacZ ont été colorées en les incubant avec le X-gal afin de vérifier l'efficacité de la transfection (**Figure III-15**). Ceci nous a permis d'estimer à environ 10% le nombre de cellules transfectées.

Nous avons ensuite réalisé un western blot sur les lysats cellulaires ainsi que sur les surnageants concentrés, avec d'une part un anticorps anti-V5 (**Figure III-16**) et d'autre part un anticorps anti-apo J (Rockland, U.S.A.) (**Figure III-17**). Le western blot a été réalisé en conditions réductrices et non réductrices afin de visualiser la protéine sous sa forme dimérique et monomérique.

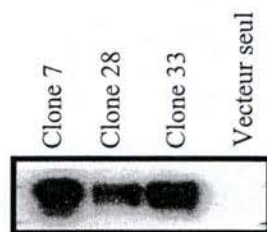
Malgré un niveau protéique d'apo J beaucoup plus faible dans le clone 7, celui-ci semble bien sécréter de l'apo J dans le surnageant, dans une mesure comparable aux autres clones.

La présence de l'apo J monomérique et dimérique semble se confirmer dans le surnageant des différents clones, alors que l'apo J intracellulaire est à peine détectable dans les lysats cellulaires, suggérant notamment que l'apo J est rapidement sécrétée après sa synthèse.

Surnageants

Conditions non réductrices

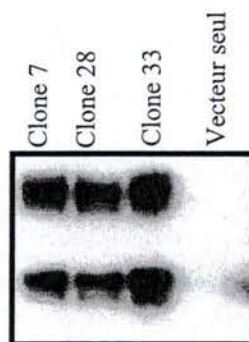
A



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Conditions réductrices

B



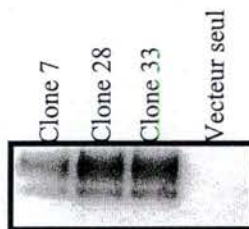
Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Apo J monomérique : ≈ 40 kDa

Lysats cellulaires

Conditions non réductrices

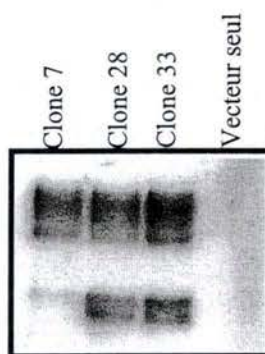
C



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Conditions réductrices

D



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Apo J monomérique : ≈ 40 kDa

Figure III-16: Western blots sur des cellules COS transfectées avec le vecteur pcDNA3.1.A + apo J et le vecteur pcDNA3.1.A seul, en utilisant un anticorps anti-V5.

A : Surnageants en conditions non réductrices

B : Surnageants en conditions réductrices

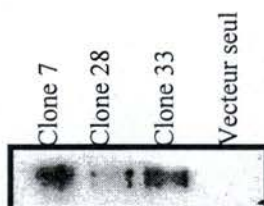
C : Lysats cellulaires en conditions non réductrices

D : Lysats cellulaires en conditions réductrices

Surnageants

Conditions non réductrices

A



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Conditions réductrices

B



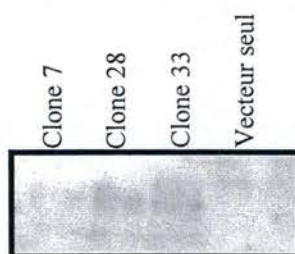
Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Apo J monomérique : ≈ 40 kDa

Lysats cellulaires

Conditions non réductrices

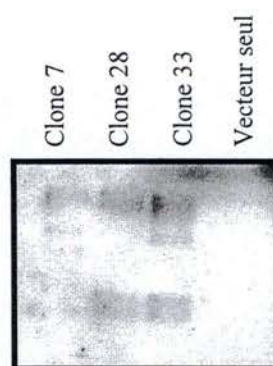
C



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Conditions réductrices

D



Apo J dimérique : ≈ 65 kDa

Apo J monomérique : ≈ 40 kDa

Figure III-17: Western blots sur des cellules COS transfectées avec le pcDNA3.1.a + apo J et le pcDNA3.1.A seul réalisé avec un anticorps primaire anti-Apo J.

A : Surnageants en conditions non réductrices

B : Surnageants en conditions réductrices

C : Lysats cellulaires en conditions non réductrices

D : Lysats cellulaires en conditions réductrices

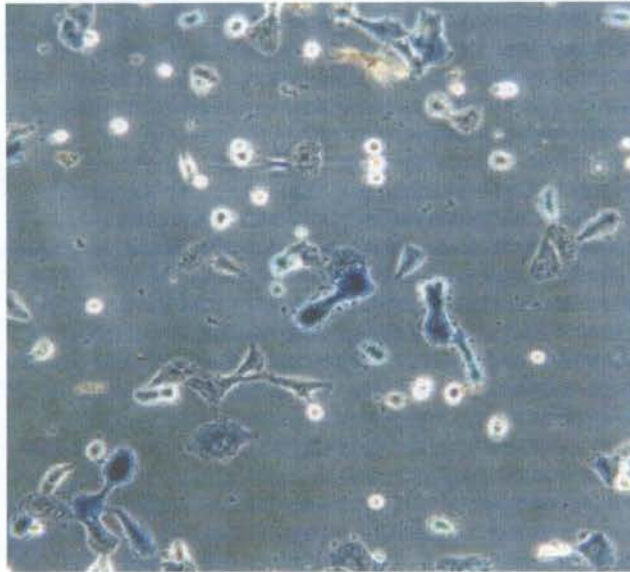


Figure III-18: Coloration des fibroblastes SV40 ayant été transfectés avec le vecteur pcDNA3.1.A + LacZ. Les cellules bleues sont les cellules ayant incorporé le vecteur.

Ces résultats nous ont permis de confirmer que l'apo J était bien synthétisée avec son « tag » et sécrétée par les cellules et que sa dimérisation ne semblait pas être gênée par le « tag ».

III.2.2.3 Transfection stable dans les fibroblastes immortalisés de souche SV-40

Suite aux résultats obtenus après la transfection dans les cellules COS, nous avons décidé d'effectuer une transfection stable dans les fibroblastes SV-40 afin de réaliser un test de cytotoxicité.

Cette fois, les cellules ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium (kit CalPhos-QIAGEN). Nous avons réalisé des transfections avec :

- le plasmide pcDNA3.1.A seul,
- le plasmide pcDNA3.1.A +apo J (issu des colonies 7, 28 et 33),
- le plasmide contrôle pcDNA3.1.A + LacZ.

Après 48 heures, nous avons coloré les cellules transfectées avec le pcDNA3.1.A +LacZ, ce qui nous a permis de confirmer un taux de transfection important (**Figure III-18**).

Nous avons dès lors commencé une sélection avec l'antibiotique G418 (= généticine) sur les cellules transfectées afin d'obtenir une lignée de cellules transfectées.

III.2.2.3.1 Western blot

Après 10 jours de sélection, nous avons réalisé un western blot sur les lysats cellulaires ainsi que le surnageant des cellules transfectées.

Nous avons dans chaque cas utilisé les anticorps anti-V5 et anti-apo J (ici = Santa Cruz anti- β , U.S.A.) (**Figure III-19**). Nous confirmons ainsi la présence de l'apo J portant le « tag » 6His/V5 dans le lysat et dans le surnageant des cellules SV-40 en employant l'anticorps anti-V5.

On remarque également, via l'utilisation de l'anticorps anti-apo J, la nette surexpression de l'apo J chez les cellules transfectées aussi bien au niveau du surnageant qu'au niveau du lysat où l'apo J endogène est à peine perceptible. Notons que la présence de la forme monomérique de l'apo J au niveau des lysats n'a pu être démontrée lors de cette expérience, ceci est probablement dû à la faible quantité d'apo J présente dans les lysats.

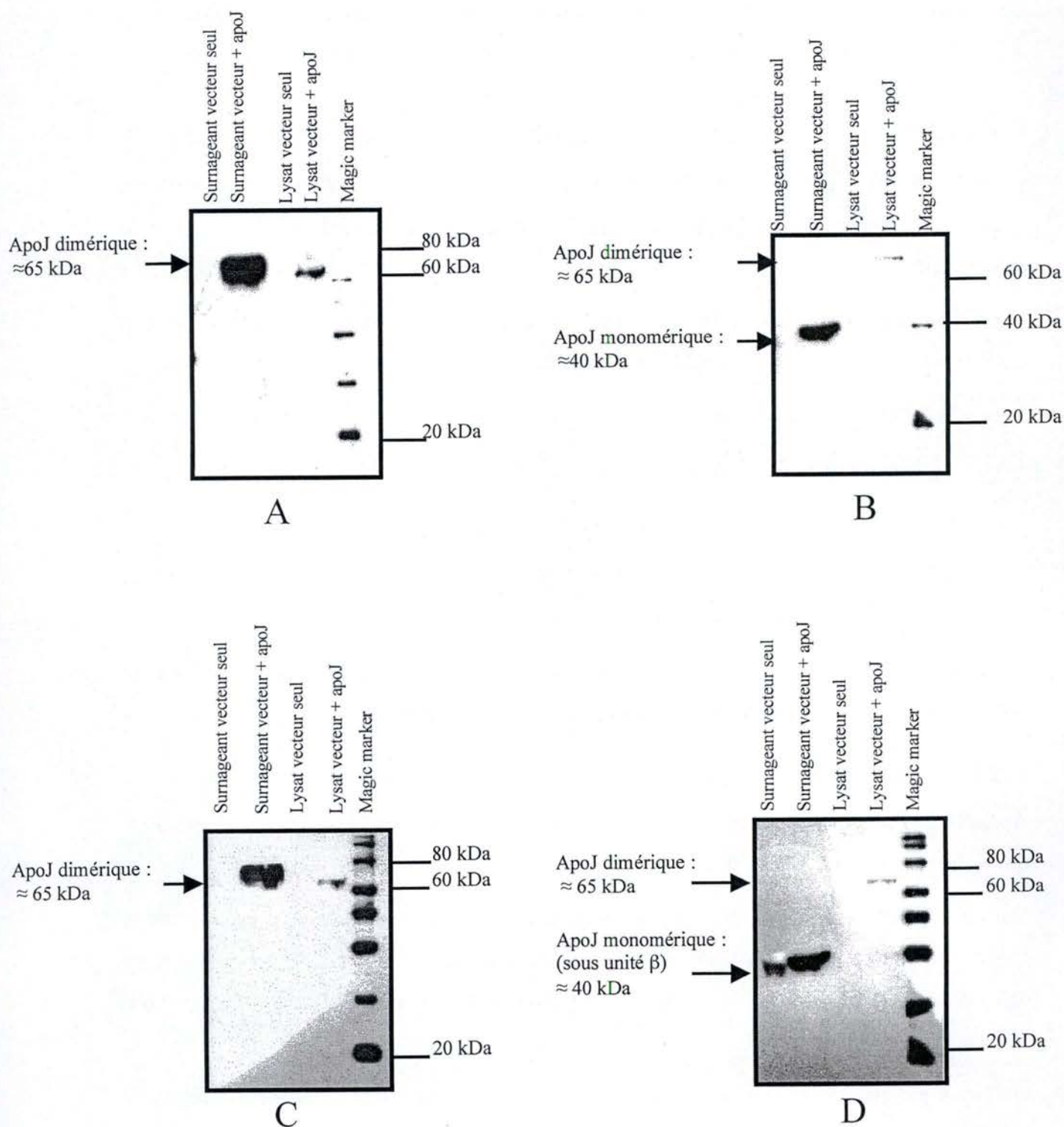


Figure III-19: Western blots réalisés sur les cellules SV40 transfectées avec le vecteur pcDNA3.1.A seul ou le vecteur pcDNA3.1.A + apo J.

A : En conditions non réductrices avec un anticorps anti-V5.

B : En conditions réductrices avec un anticorps anti-V5.

C : En conditions non réductrices avec anticorps anti-apo J.

D : En conditions réductrices avec anticorps anti-apo J.

III.2.2.3.2 Stress cytotoxiques.

Afin de mettre en évidence un éventuel effet protecteur de l'apo J contre les stress U.V.B, nous avons réalisé une courbe de cytotoxicité suite à un stress sous éthanol (EtOH), *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) ou sous U.V.B. réalisé sur des fibroblastes SV-40 transfectés avec le pcDNA3.1A seul ou avec le pcDNA3.1A + apo J.

Pour cela, nous avons effectué un stress de 2 heures avec l'EtOH (0 à 8% v : v) ou avec du *t*-BHP (0 à 1500 μ M) dilué dans du milieu de culture MEM, et des stress sous U.V.B. avec une dose d'exposition croissante (0 à 5000 mJ/cm²) réalisés comme expliqué dans la section matériels et méthodes.

A 24 heures après le stress, les cellules ont été lysées et un dosage des protéines cellulaires a été réalisé, nous permettant de déterminer la survie cellulaire après ces stress. Cette méthode a déjà souvent été utilisée dans ce cadre avec succès (Dumont *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2002).

Afin de confirmer les résultats obtenus, la manipulation a été réalisée 2 fois, en quadruple. Nous remarquons qu'il y a une mortalité plus accrue pour les 3 types de stress chez les cellules transfectées avec le pcDNA3.1.A + apo J (**Figure III-20**). Ceci ne va pas dans le sens d'une protection de l'apo J. Pour pouvoir aller de l'avant, nous avons émis l'hypothèse que ce serait dû à une hypersynthèse de la protéine, épuisant la cellule au détriment de ses mécanismes de réparation. Une seconde hypothèse serait que cette mortalité accrue proviendrait de la présence du « tag » qui interférerait au niveau du rôle de protection de la protéine apo J.

Afin de pouvoir réaliser la transfection rétrovirale au moyen de l'apo J taggée, une troisième construction a été réalisée, dans le vecteur pLXSN. La transfection rétrovirale est un procédé permettant une transfection stable à longue échéance, en ayant un taux de transfection élevé nécessitant une sélection relativement courte. Ce procédé nous permettra de transfecter des fibroblastes normaux et ainsi de pouvoir étudier l'influence de la surexpression de l'apo J lors de l'apparition prématurée des biomarqueurs en SIPS. De plus le pLXSN est un vecteur disposant d'un promoteur plus faible que celui du vecteur pcDNA3.1.A, ce qui nous permettra de vérifier si une surexpression trop importante de la protéine exerce un effet négatif sur les cellules.

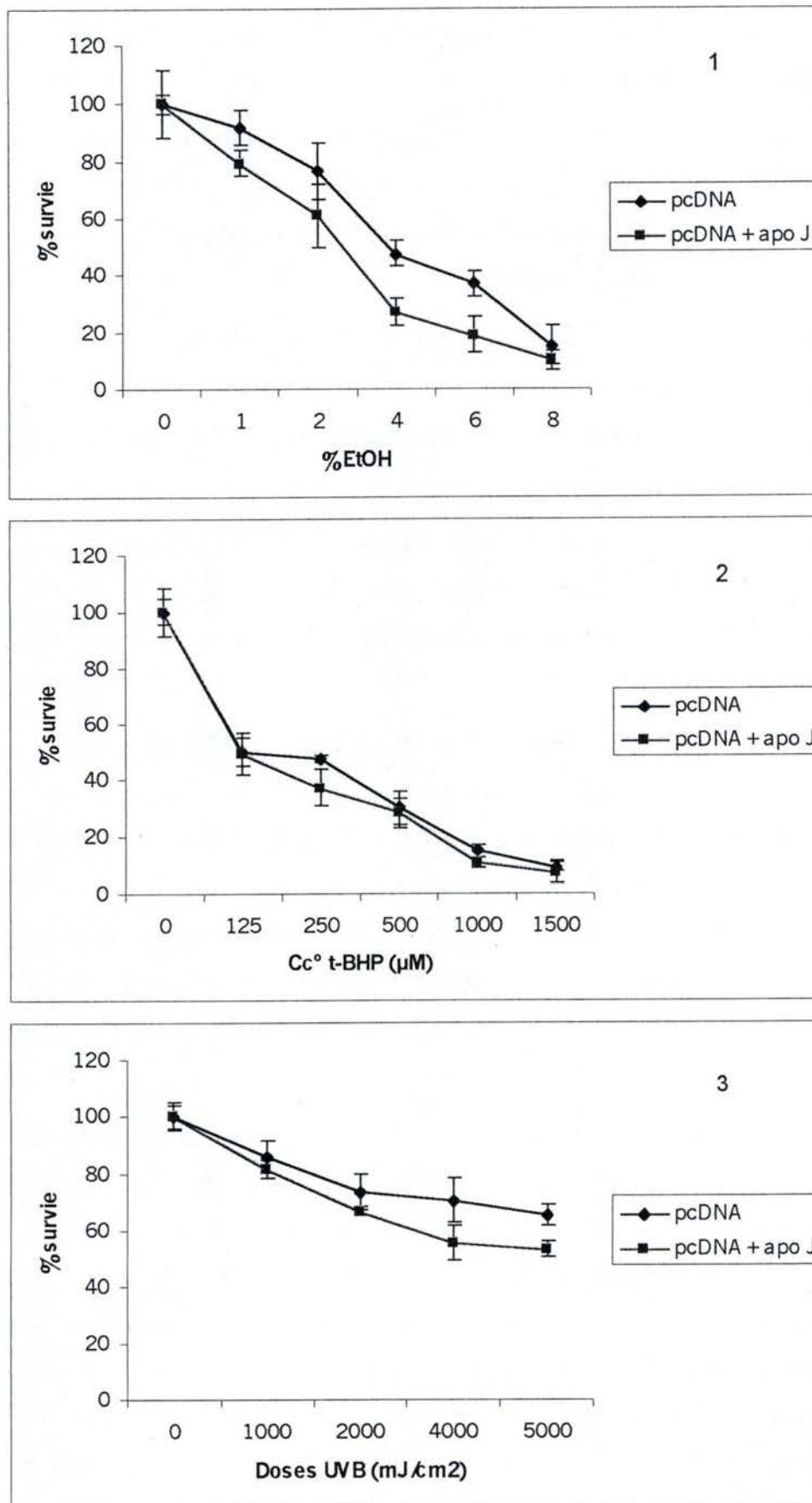


Figure III-20: Courbes de cytotoxicité réalisées après les stress cytotoxiques réalisés avec des doses croissantes d'éthanol (1), de t-BHP (2) et d'U.V.B (3) sur les cellules SV-40 transfectées avec le vecteur pcDNA3.1.A + apo J ou le vecteur pcDNA3.1.A seul.

III.2.3 Clonage de l'apo J humaine avec « tag » dans le vecteur pLXSN

Afin de sous-cloner de l'apo J humaine avec "tag" dans le vecteur pLXSN, nous avons réalisé une PCR au moyen d'amorces à "bouts flottants" contenant les sites de restriction pour les enzymes BamHI et HpaI (**Figure III-21**). L'ensemble des produits PCR a été purifié par le kit QIAquick. Ensuite, ce produit purifié a été restreint par les enzymes de restriction BamHI et HpaI et lié avec le vecteur pLXSN, lui aussi restreint par ces 2 mêmes enzymes.

Après plusieurs tentatives de transformation de ce produit de ligation, aucune colonie ne semblait posséder l'insert. Un sous-clonage intermédiaire de notre produit PCR résultant de la PCR à amorces flottantes a été réalisé dans le vecteur PCR2.1-TOPO. A partir de celui-ci l'insert a été restreint par les enzymes BamHI et HpaI. Nous avons obtenu 2 colonies possédant l'insert cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO. De celles-ci, l'insert a été extrait par restriction avec les enzymes BamHI et Hpa I. Après purification de ce produit de restriction en utilisant le kit QIAquick, une ligation a été réalisée avec le vecteur pLXSN lui aussi restreint avec les 2 mêmes enzymes. Après transformation et PCR de criblage avec les amorces à "bouts flottants" APOJPN F et APOJPN R, nous avons obtenu 2 colonies positives (**Figure III-22**). Nous avons réalisé une restriction BamHI/HpaI sur les produits mini-preps issus de ces 2 colonies positives et nous avons obtenu une bande de la taille attendue pour les 2 colonies (**Figure III-23**). Ces 2 colonies ont ensuite été envoyées au séquençage complet pour confirmation.

En conclusion, le vecteur rétroviral portant l'ADN_c de l'apo J humaine est à présent disponible. La transfection des fibroblastes SV-40 est en cours.

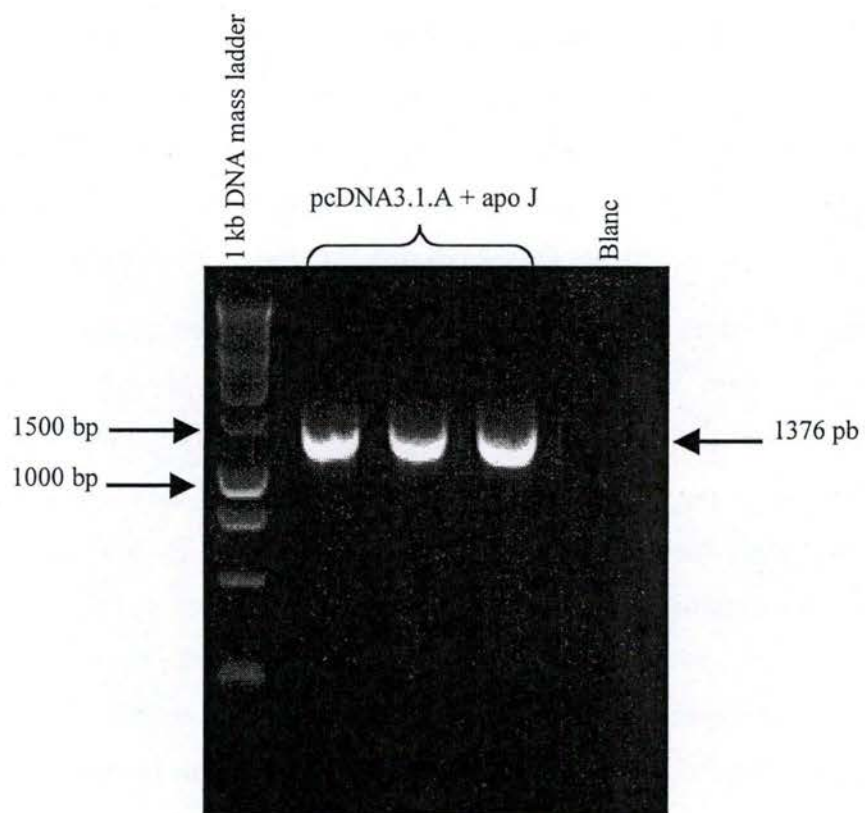


Figure III-21: Produits de PCR résultant de la PCR à amorces à bouts flottants contenant les sites BamHI et HpaI afin de permettre le sous clonage de l'apo J « taggée » dans le vecteur pLXSN.

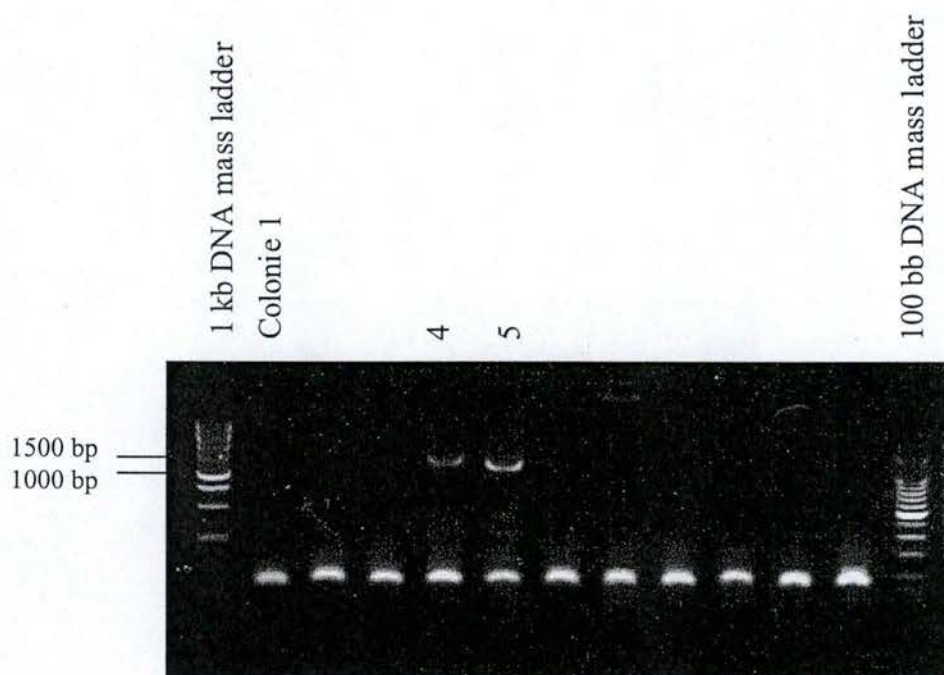


Figure III-22: PCR de criblage réalisée sur les clones positifs suite à la transformation dans *E.Coli* du produit de ligation pLXSN + apo J « taggée ».

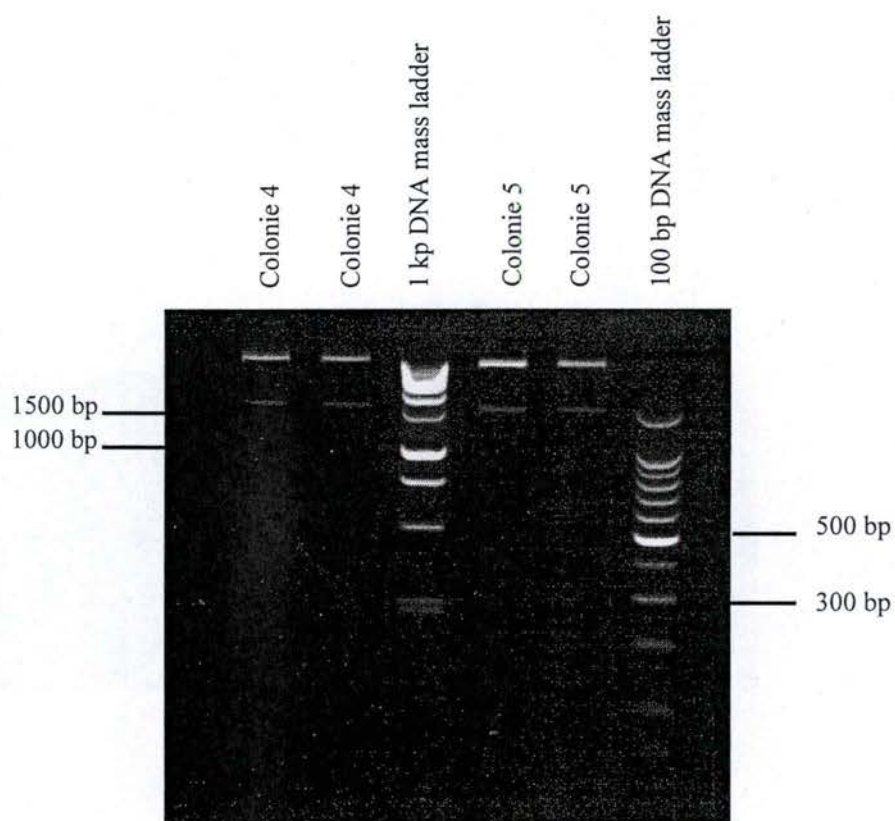


Figure III-23: Restriction avec les enzymes BamHI/HpaI sur les produits obtenus après minis-préparations d'ADN plasmidiques. Les 2 colonies montrent un profil de restriction attendu.

**Discussion
et
Perspectives**

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail visait tout d'abord à terminer la mise au point d'un modèle de stress successifs sous U.V.B de manière à savoir si les effets à long terme de ces stress se rapprocheraient de la sénescence répllicative. Ensuite, vu le rôle que joue l'apo J contre de nombreux types de stress, nous nous sommes demandés si une éventuelle surexpression de l'apo J pourrait jouer un rôle protecteur contre des stress. Nous avons comme idée de base que, si l'apo J est surexprimée lors de stress répétés sous U.V.B, elle pourrait protéger les cellules contre des stress ultérieurs. Ceci rentre bien dans le consensus général qui est de penser que les cellules sénescents et dans un état de sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques, sont résistantes à de nombreux stress et stimuli pro-apoptotiques.

En ce qui concerne la mise au point du modèle de SIPS induite par les U.V.B, nous retrouvons des résultats assez semblables à ceux obtenus pour d'autres types de stress tels que H₂O₂ ou le *t*-BHP. Globalement, les différents biomarqueurs étudiés montrent que, après les stress sous U.V.B, nous nous retrouvons en présence d'une culture présentant des caractéristiques pré-sénescents.

En effet, le pourcentage de cellules positives pour la SA- β gal augmente après les stress mais n'atteint pas les 55 % de cellules positives observées chez les fibroblastes de souche FS à 90 % de leur capacité proliférative. On observe une forte diminution du potentiel prolifératif après les stress de plus de 65 %, mais celle-ci n'atteint pas les 90-95 % observés chez les cellules FS sénescents (Dumont *et al.*, 2000). Enfin, on observe une augmentation du niveau de transcrit de l'apo J et de l'ostéonectine, mais pas de SM22 et de la fibronectine, alors que ces 4 niveaux de transcrits sont augmentés chez les cellules FS sénescents.

On peut émettre l'hypothèse que l'augmentation limitée des niveaux de transcrits de la fibronectine et SM22, observée chez les cellules sénescents, ne se retrouve pas dans une population de cellules exposée aux U.V.B à cause du fait que la proportion de cellules en SIPS n'y atteint pas 100 %. L'effet d'augmentation du niveau des transcrits de la fibronectine et SM22 est dilué puisque l'on réalise la Real Time PCR à partir de l'ARNm de toute la population cellulaire exposée aux U.V.B et non pas seulement à partir des cellules en SIPS générées par les U.V.B.

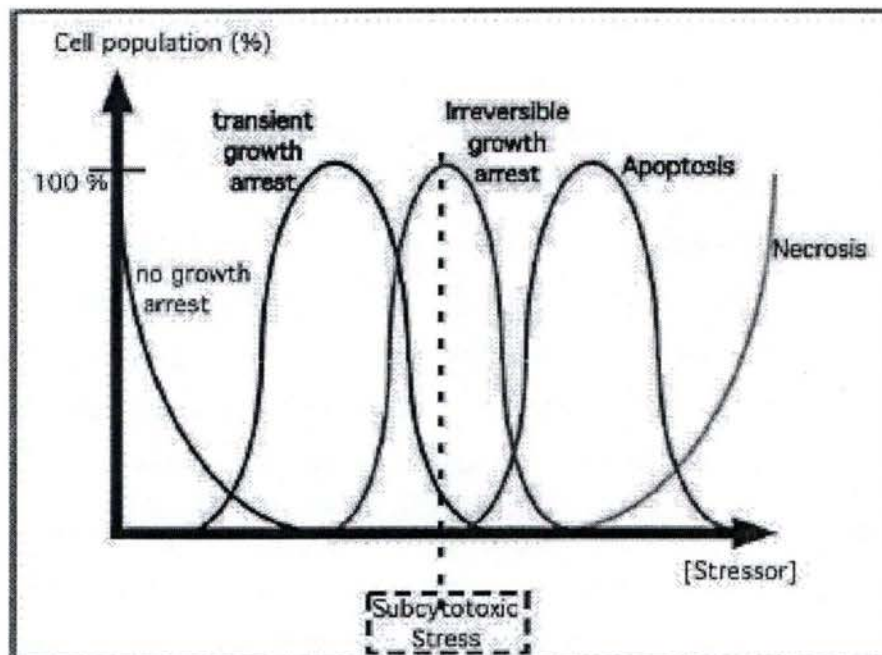


Figure IV-1 : Quand une population d'un type cellulaire donné est exposée à des stress subcytotoxiques, une grande majorité de cellules arrête leur croissance de façon irréversible et deviennent prématurément sénescents, avec une minorité de cellules pouvant éventuellement retourner en mitose (Toussaint *et al.*, 2002).

Comment remédier à cela ? La méthode la plus directe consisterait à purifier les cellules en SIPS au sein de la population de cellules qui a été exposée aux U.V.B. Nous n'avons actuellement aucun moyen de réaliser cela.

Des études protéomiques pourraient être réalisées à partir de protéines de membranes plasmiques cellulaires et permettraient de voir si le niveau protéique d'un récepteur membranaire particulier est modifié, ceci conduisant ultérieurement au tri des cellules en utilisant des anticorps marqués par exemple avec des fluorochromes et reconnaissant ces éventuels récepteurs.

Pourrait-on résoudre les problèmes dus au fait de l'hétérogénéité de la population exposée aux U.V.B, avec une proportion non totale de cellules entrant en SIPS, en augmentant la dose d'U.V.B ? En fait, cette dose d'U.V.B a été calibrée de manière à ne pas être cytotoxique et donc augmenter la dose reviendrait à tuer une partie de la population. Vu la lourdeur expérimentale d'un modèle avec 10 stress, on peut difficilement augmenter le nombre de stress. Notons que des expériences ont déjà été réalisées avec seulement 3 et 5 stress, et que la proportion de cellules en SIPS était moindre que celle observée après 10 stress. Ceci suggère que l'exposition de cellules à un nombre plus élevé de stress, fussent-ils d'intensité moindre considérés individuellement, mais toujours sous le seuil de la cytotoxicité lorsqu'ils sont considérés comme stress cumulés, favorise l'entrée des cellules en SIPS.

Il faut de toute façon considérer que la réponse d'une population cellulaire à un stress n'est pas identique pour toutes les cellules. Si on augmente l'intensité (dose, durée) d'un stress, on voit apparaître différents comportements cellulaires, allant d'un retour des cellules à leur état initial d'avant stress (réparation totale des dommages), à une nécrose, en passant par l'induction de la SIPS et/ou l'apoptose, selon le type cellulaire. Cependant, on peut par exemple, à cause de l'inhomogénéité inhérente aux cellules de départ, observer pour une intensité de stress donnée, que des cellules reviennent à leur état initial, que d'autres entrent en SIPS, alors que d'autres encore entrent en apoptose ou en nécrose.

Dans nos expériences, nous avons décidé de nous mettre en conditions non cytotoxiques, et donc à côté des cellules qui entrent en SIPS, se retrouvent aussi des cellules revenant à leur état initial (**Figure IV-1**) (Toussaint *et al.*, 2002).

Ceci étant dit, l'augmentation de niveau de transcrit de l'apo J et de l'ostéonectine n'est pas banale. On sait par exemple que l'ostéonectine est capable de se lier au PDGF (platelet-derived growth factor) et de ce fait diminue le potentiel prolifératif des cellules. Ceci cadre

bien dans la diminution de potentiel prolifératif observé en SIPS (Dumont *et al.*, 2002). Une détermination du niveau protéique de l'ostéonectine après ces stress U.V.B serait bienvenue, bien que cela n'était pas notre objectif initial. Par contre, nous montrons, pour la première fois dans des études sur la SIPS, que l'augmentation du niveau de transcrits de l'apo J s'accompagne bien d'une augmentation du niveau protéique dans les lysats cellulaires ainsi que dans le surnageant cellulaire, après les dix stress aux U.V.B. Vu ce résultat marquant, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une surexpression de l'apo J. L'apo J de chien avait déjà été transfectée au sein de fibroblastes WI-38 et SV-40 (Dumont *et al.*, 2002). Divers types de stress cytotoxiques et subcytotoxiques avaient été réalisés et l'apo J ne s'était pas révélée protectrice contre les stress cytotoxiques au t-BHP et à l'EtOH, et n'avait montré aucune protection pour les stress à l'H₂O₂. De plus, les stress aux U.V.B n'avaient pas été testés.

Pour ce faire, il fallait tout d'abord mener à bien la construction des différents vecteurs, ce que nous sommes parvenus à réaliser. En parallèle, il fallait s'assurer du fait que les constructions étaient bien fonctionnelles. Nous avons donc transfecté des cellules COS et avons bien montré que l'apo J issue de ces constructions, est bien libérée dans le surnageant des cellules. Au niveau des western blots réalisés sur ces cellules, une surexpression chez les cellules transfectées avec le pcDNA3.1.A + apo J a bien été observée et l'apo J mise en évidence sur les western blots possède la même taille que lors des ceux réalisés sur les fibroblastes FS exposés aux U.V.B. Deux types de conditions ont été réalisées, réductrices et non-réductrices. Les profils obtenus en conditions réductrices montrent une réduction de la protéine partielle, c'est-à-dire que les 2 formes, dimérique et monomérique, sont observées. La quantité observée dans les lysats est fort faible, ce qui pourrait être expliqué par le fait que l'apo J est une protéine principalement sécrétée et que peu de protéines seraient détectables dans le lysat cellulaire.

Ces expériences ont été menées en utilisant les constructions possédant un promoteur fort, ceci pour augmenter les chances de détecter de l'apo J dans le surnageant cellulaire. Il y a de fortes présomptions en faveur du fait que cette situation ne présente pas des conditions physiologiques pour une cellule, cette situation épuisant ses ressources énergétiques non infinies, pour produire une protéine recombinante et devenant de ce fait plus sensible à des stress de diverses natures. Pour illustrer ces présomptions, notons que le laboratoire a observé qu'une diminution des ressources énergétiques cellulaires, par exemple suite à un découplage

mitochondrial partiel, provoquait une diminution des capacités de défense face à des stress sous t-BHP et sous éthanol (Toussaint *et al.*, 1994).

Cependant, pour réaliser un test préliminaire pendant que nous construisions le vecteur rétroviral utilisable chez des fibroblastes non immortalisés, nous avons transfecté des fibroblastes immortalisés par l'antigène SV-40 avec cette construction à promoteur fort. Après exposition à des stress cytotoxiques, nous n'avons pu observer aucun effet protecteur de l'apo J produite par ce vecteur. Il faudra donc attendre les résultats obtenus lorsque des cellules auront été transfectées avec un vecteur à promoteur moins fort. De plus cette construction possède un "tag" permettant de différencier l'apo J endogène de l'apo J recombinante. Celui-ci pourrait modifier et éventuellement gêner sa fonction au sein de la cellule.

On peut aussi s'attendre à ce que des fibroblastes non immortalisés répondent différemment aux stress. Enfin, il est aussi possible que l'apo J protège contre l'apparition de biomarqueurs de la sénescence après des stress faibles (subcytotoxiques) sans forcément protéger contre des stress cytotoxiques.

Nous pourrions aussi produire de l'apo J recombinante en transfectant notre construction dans le pcDNA 3.1.A 6His/V5 + apo J dans des cellules de type CHO. Ainsi, nous pourrions purifier l'apo J recombinante sur une colonne de nickel grâce à son tag 6-His. Nous pourrions alors réaliser des expériences supplémentaires en effectuant des stress cytotoxiques de différentes natures sur divers types cellulaires et en ajoutant de l'apo J purifiée à diverses concentrations dans le surnageant, détecter de nouveau un effet protecteur.

L'étude développée dans ce cadre s'attache à l'expression de quelques gènes. Une perspective pourrait être d'étudier la variation transcriptomique d'un grand nombre de gènes en utilisant des microdamiers à ADN pour étudier simultanément les variations de niveaux de nombreux transcrits présents dans les fibroblastes en SIPS induite par l'exposition des cellules aux U.V.B. Une seconde étude pourrait s'attacher à la variation de niveaux des protéines exprimées dans ces conditions, via la réalisation de gels protéiques en 2 dimensions.

En conclusion, les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible d'induire la SIPS chez les fibroblastes humains diploïdes après leur exposition à des doses subcytotoxiques d'U.V.B. On sait que les fibroblastes humains diploïdes pré-sénescents et sénescents peuvent promouvoir la croissance et la transformation de cellules épithéliales pré-cancéreuses et cancéreuses, ces effets étant accentués chez les cellules sénescents et chez les cellules en

SIPS induite sous H_2O_2 (Krtolica *et al.*, 2001). On pourrait donc étudier si les fibroblastes de peau en SIPS induite sous U.V.B, entraînent les mêmes effets de prolifération sur les cellules de mélanomes. En effet, les U.V.B traversent l'épiderme, qui contient les kératinocytes et mélanocytes, avant d'atteindre le derme supérieur, qui contient les fibroblastes. On pourrait donc tester si les fibroblastes de peau entrés en SIPS induite par les U.V.B stimulent la croissance des mélanocytes ou des cellules de mélanomes.

Bibliographie

V BIBLIOGRAPHIE

- Allsopp R. C., *Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA*, *Epx. Gerontol.*, 31, 235-243, 1996.
- Atadja P. W., K. F. Stringer *et al.*, *Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging*, *Mol Cell Biol*, 14, 4991-9, 1994.
- Bailey R. and M. D. Griswold, *Clusterin in the male reproductive system : localization and possible fonction*, *Molecular and cellular endocrinology*, 17-23, 1998.
- Bayreuther K., H. P. Rodemann *et al.*, *Differentiation of fibroblast stem cells*, *J Cell Sci Suppl*, 10, 115-30, 1988a.
- Bayreuther K., H. P. Rodemann *et al.*, *Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5112-6, 1988b.
- Blaschke V., K. Reich *et al.*, *Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology*, *J Immunol Methods*, 246, 79-90, 2000.
- Bodnar A. G., M. Ouellette *et al.*, *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*, *Science*, 279, 349-52, 1998.
- Bustin S. A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93, 2000.
- Campisi J., *Replicative senescence and immortalization*, in "The molecular basis of cell cycle and growth control", G. S. Stein (Eds), 348-373, 1996.
- Campisi J., G. P. Dimri *et al.*, *control of replicative senescence*, in "Handbook of the biology of aging", N. Holbrook (Eds), 121-148, 1996.
- Dimri G. P., X. Lee *et al.*, *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7, 1995.

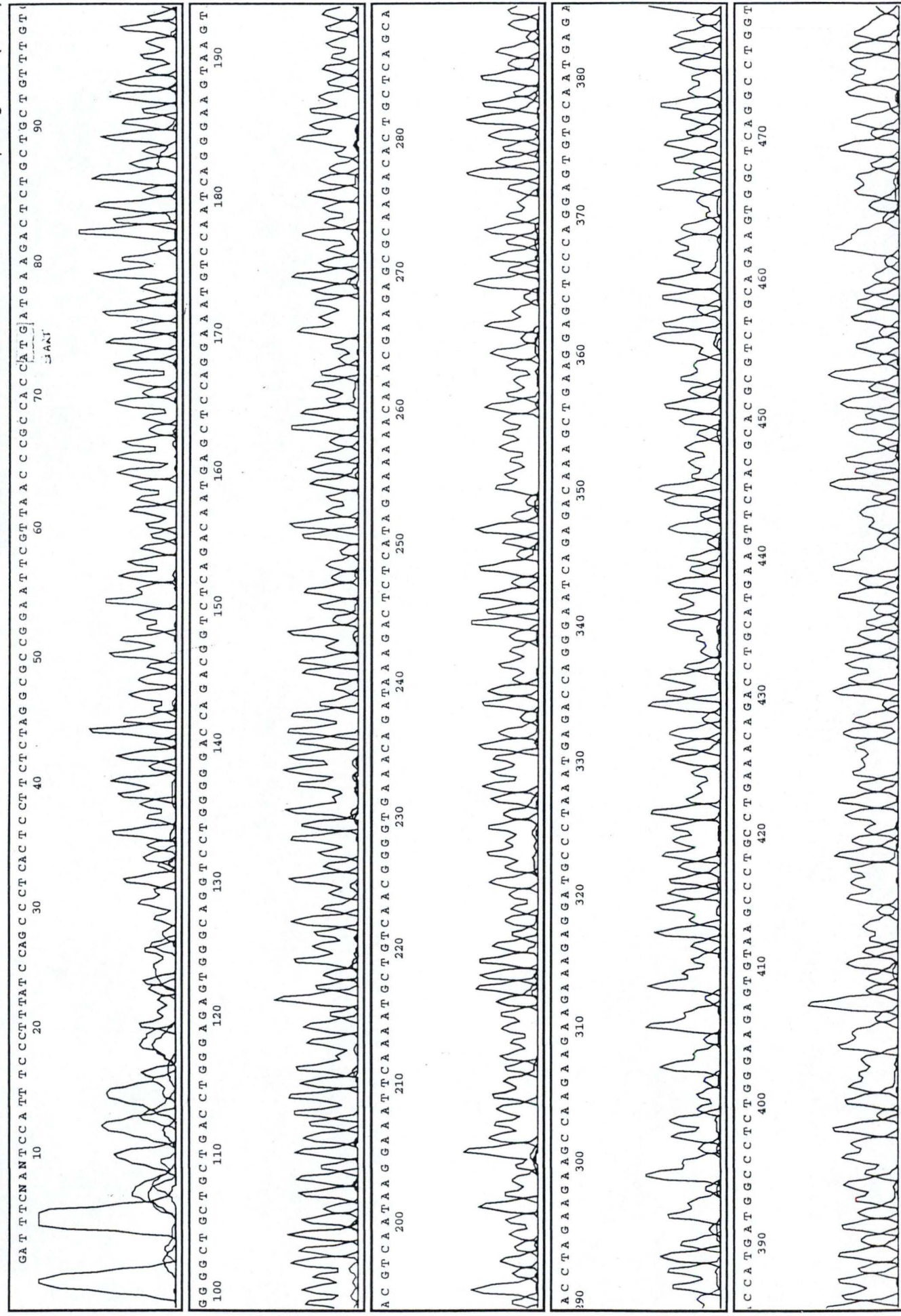
- Dimri G. P., M. Nakanishi *et al.*, *Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein*, Mol Cell Biol, 16, 2987-97, 1996.
- Dumont P., M. Burton *et al.*, *Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast*, Free Radic Biol Med, 28, 361-73 , 2000.
- Dumont P., F. Chainiaux *et al.*, *Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide*, Cell Stress Chaperones, 7, 23-35 , 2002.
- Dumont P., V. Royer *et al.*, *Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence*, FEBS Lett, 502, 109-12 , 2001a.
- Epe B., *DNA damage induced by photosensitization*, in "Oxidative stress", H. Sies (Eds), Academic Press Inc., 41-65, 1985.
- Farnham P. J., J. E. Slansky *et al.*, *The role of E2F in the mammalian cell cycle.*, Biochim. Biophys. Acta, 1155, 125-131, 1993.
- Gerland L. M., M. Ffrench *et al.*, *[Cyclin dependent kinase inhibitors and replicative senescence]*, Pathol Biol (Paris), 49, 830-9, 2001.
- Good L., G. P. Dimri *et al.*, *Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence*, J Cell Physiol, 168, 580-8, 1996.
- Greider C. W. and E. H. Blackburn, *Telomeres, telomerase and cancer*, Sci Am, 274, 92-7., 1996.
- Gonos E. S., A. Derventzy, M. Kveiborg, G. Agiostratidou, M. Kassem, B. F. Clark, P. S. Jat and S. I. Rattan, *Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence.*, Exp. Cell Res., 240, 66-74, 1998.
- Harley C. B., A. B. Futcher *et al.*, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*, Nature, 345, 458-60 , 1990.
- Hayflick L , *The cellular basis for biological aging*, in "Handbook of biological aging", L. a. F. Hayflick, C.E. (Eds), Van Nostrand Reinhold Company, 1, 159-186, 1977.

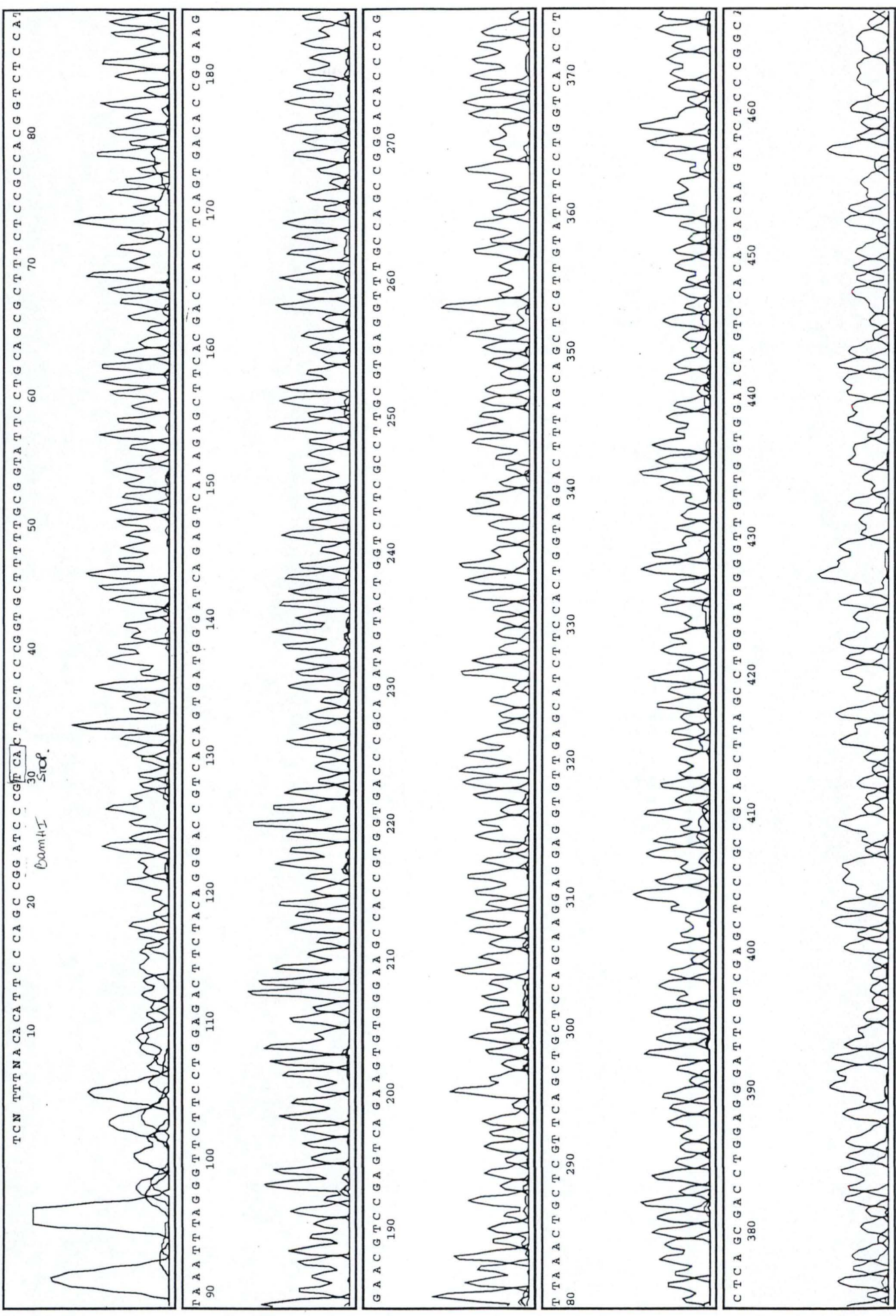
- Hayflick L. and P. S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strain*, Exp. Cell Res., 25, 585-621, 1961.
- Humphreys D. T., J. A. Carver *et al.*, *Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins*, J Biol Chem, 274, 6875-81, 1999.
- Jenne D. E. and J. Tschopp, *Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein*, Trends Biochem Sci, 17, 154-9, 1992.
- Krtolica A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi, *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 12072-7, 2001.
- Kurz D. J., S. Decary *et al.*, *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*, J Cell Sci, 113 (Pt 20), 3613-22, 2000.
- Lee C. M., R. Weindruch *et al.*, *Age-associated alterations of the mitochondrial genome*, Free Radic Biol Med, 22, 1259-69, 1997.
- Lidstrom A. M., N. Bogdanovic *et al.*, *Clusterin (apolipoprotein J) protein levels are increased in hippocampus and in frontal cortex in Alzheimer's disease*, Exp Neurol, 154, 511-21, 1998.
- Lodish H., D. Baltimore *et al.*, *Molecular cell biology*, in (Eds), Scientific American, 1344, 1995.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough *et al.*, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- Michel D., G. Chatelain *et al.*, *Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene*, Biochem J, 328, 45-50., 1997.
- Mu D., C. H. Park *et al.*, *Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system*, J Biol Chem, 270, 2415-8, 1995.
- Naegeli H., *DNA structure : inherent instability and genotoxic reactions*, in "Mechanisms of DNA damage recognition in mammalian cells", (Eds), R.G. Landes company, 1997.
- Noda A., Y. Ning *et al.*, *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*, Exp. Cell Res., 211, 90-98, 1994.

- Ozawa T., S. Sugiyama *et al.*, *Mitochondrial DNA mutations and disturbances of energy metabolism in myocardium*, Jpn Circ J, 55, 1158-64, 1991.
- Pang J. H. and K. Y. Chen, *Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence*, J Cell Physiol, 160, 531-8, 1994.
- Petropoulou C., I. P. Trougakos *et al.*, *Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts*, FEBS Lett, 509, 287-97, 2001.
- Pfaffl M. W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*, Nucleic Acids Res, 29, E45-E45, 2001.
- Poon S., T. M. Treweek *et al.*, *Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway*, FEBS Lett, 513, 259-66, 2002.
- Ravitz M. J. and C. E. Wenner, *Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta*, Adv Cancer Res, 71, 165-207, 1997.
- Remacle J., A. Houbion *et al.*, *Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts comparison between young and old cells*, Bioch. Biophys. Acta, 630, 57-70, 1980.
- Sancar A., *excision repair in mammalian cells*, the journal of biological chemistry, 270, 15915-15918, 1995.
- Schwochau G. B., K. A. Nath *et al.*, *Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties*, Kidney Int, 53, 1647-53, 1998.
- Sensibar J. A., D. M. Sutkowski *et al.*, *Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin)*, Cancer Res, 55, 2431-7, 1995.
- Sesto A., M. Navarro *et al.*, *Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays*, Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 2965-70, 2002.
- Shay J. W. and W. E. Wright, *Hayflick, his limit, and cellular ageing*, Nat Rev Mol Cell Biol, 1, 72-6, 2000.

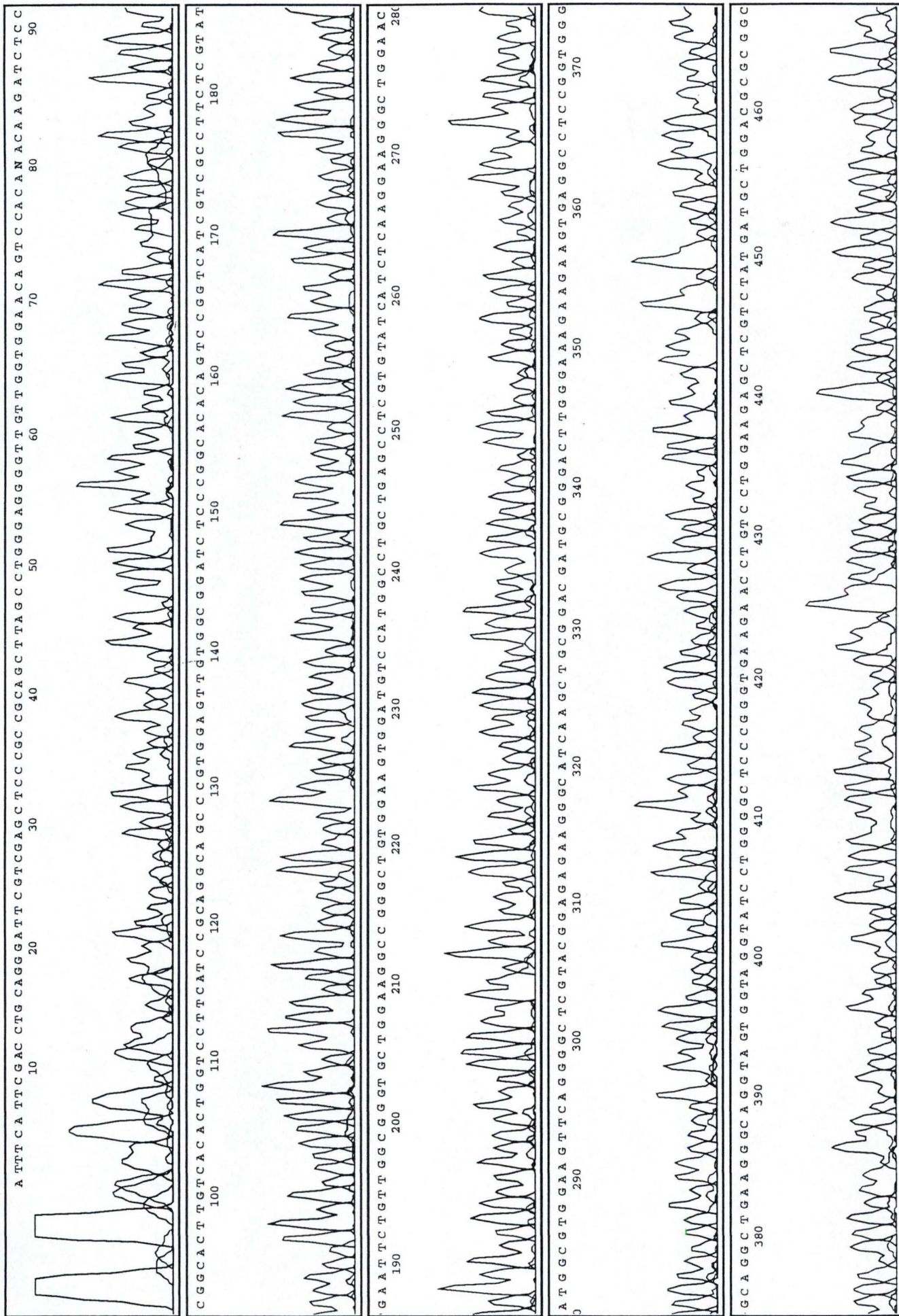
- Stein G. H., M. Beeson *et al.*, *Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts*, Science, 229, 666-669, 1990.
- Stein G. H., L. F. Drullinger *et al.*, *Senescent cells fail to express cdc2, cyca and cycb in response to mitogen stimulation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 88, 11012-11016, 1991.
- Toussaint O., P. Dumont *et al.*, *Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype : one in vivo reality, two possible definitions ? How stress, cellular behaviors, growth kinetics and cell heterogeneity interact in senescence.*, The Scientific World J., 2, 230-247, 2002.
- Toussaint O., S. Y. Fuchs *et al.*, *Reciprocal relationships between the resistance to stresses and cellular aging*, Ann N Y Acad Sci, 851, 450-65 , 1998.
- Toussaint O., A. Houbion *et al.*, *Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture*, Mech Ageing Dev, 65, 65-83 , 1992.
- Toussaint O., E. E. Medrano *et al.*, *Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes*, Exp Gerontol, 35, 927-45 , 2000.
- Toussaint O., A. Houbion and J. Remacle, *Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells*, Biochim. Biophys. Acta, 1186, 209-220, 1994
- Toussaint O., C. Michiels *et al.*, *Cellular aging and the importance of energetic factors*, Exp Gerontol, 30, 1-22, 1995.
- Tyrrell R. M., *Ultraviolet radiation and free radical damage to skin*, Biochem Soc Symp, 61, 47-53, 1995.
- Vandenbroucke, II, J. Vandesompele *et al.*, *Quantification of splice variants using real-time PCR*, Nucleic Acids Res, 29, E68-8 , 2001.
- Viard I., P. Wehrli *et al.*, *Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress*, J Invest Dermatol, 112, 290-6 , 1999.
- Wilson M. R. and S. B. Easterbrook-Smith, *Clusterin is a secreted mammalian chaperone*, Trends Biochem Sci, 25, 95-8 , 2000.
- Wright W. E. and J. W. Shay, *Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting*, Curr Opin Genet Dev, 11, 98-103 , 2001.

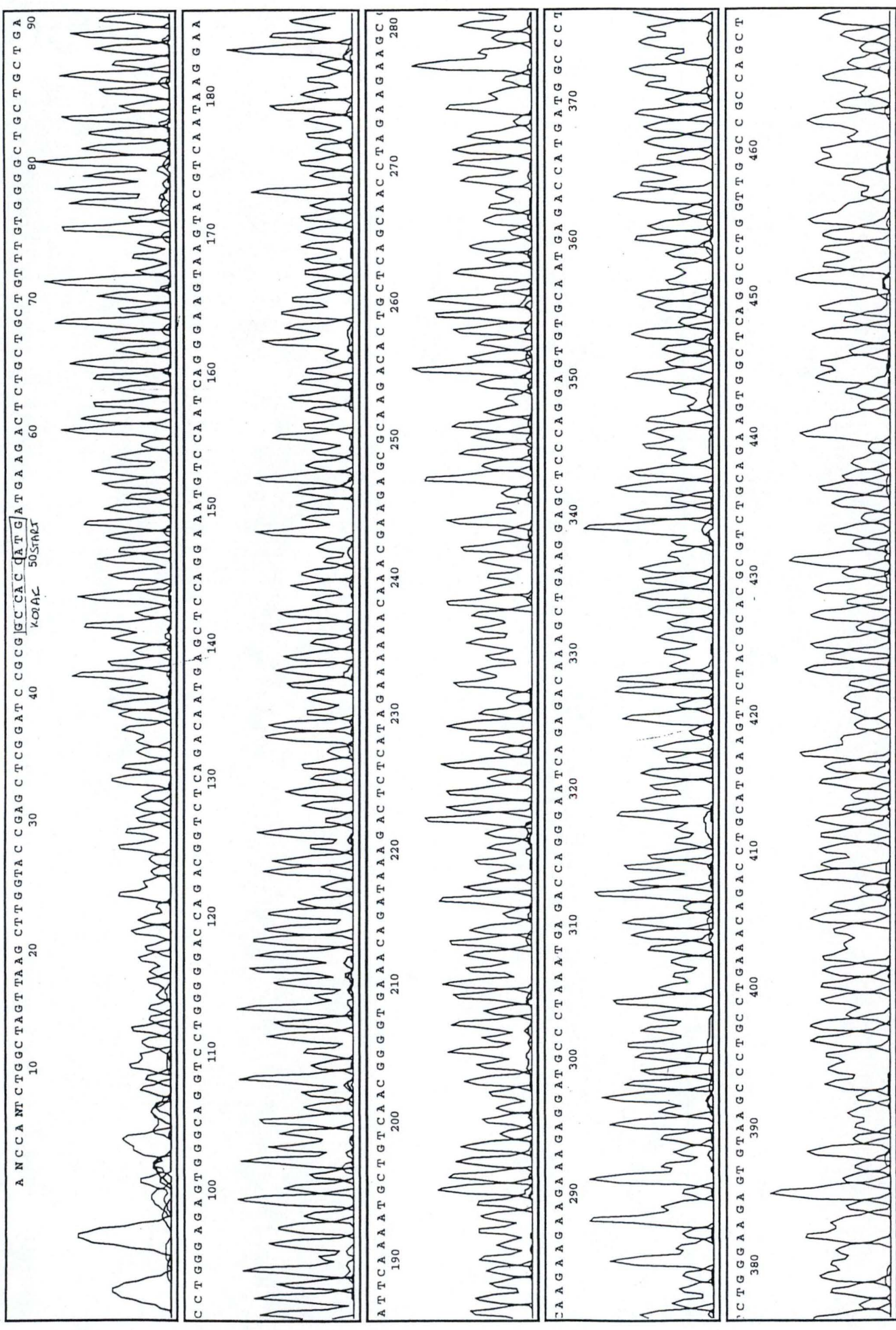
Annexes

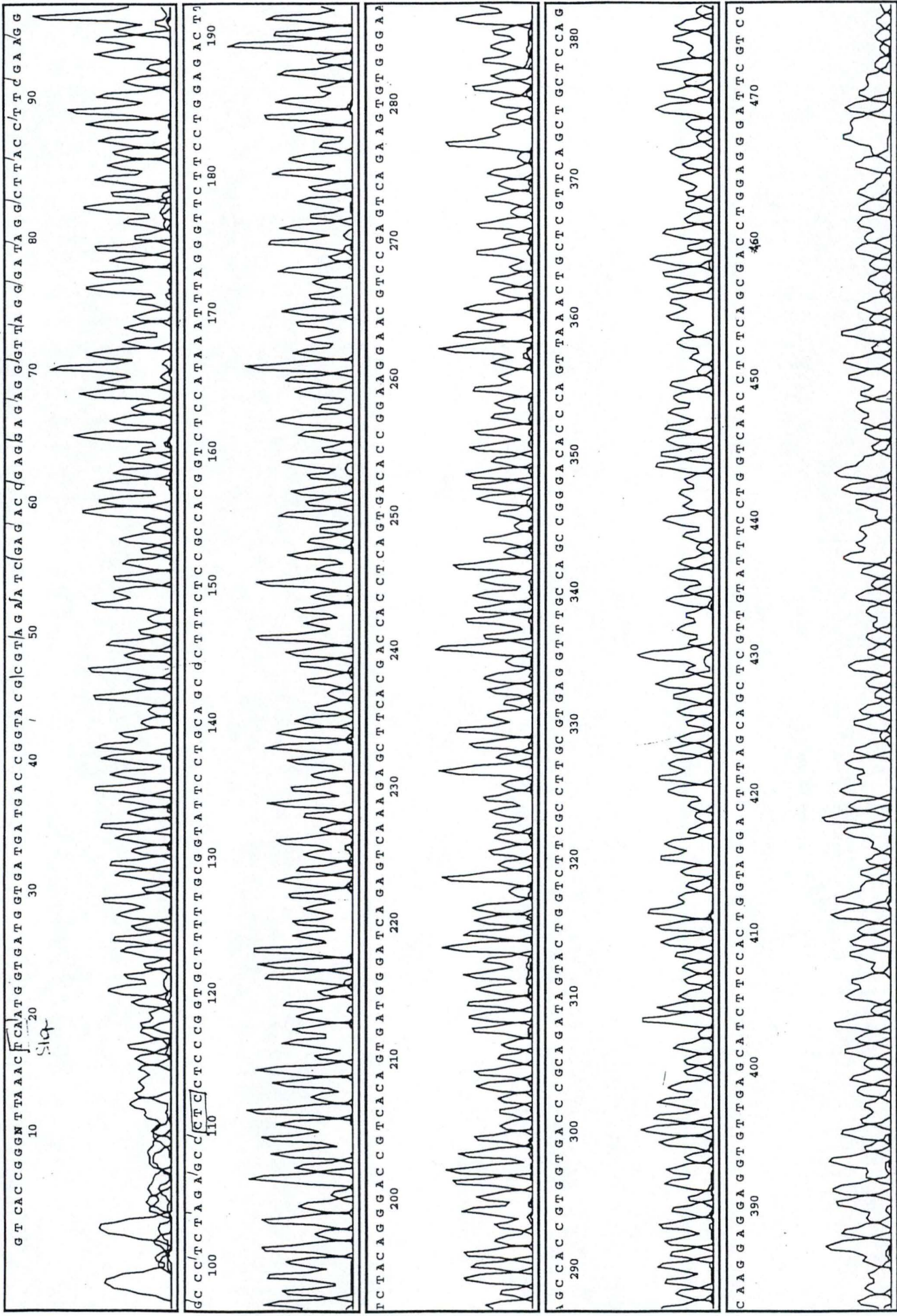


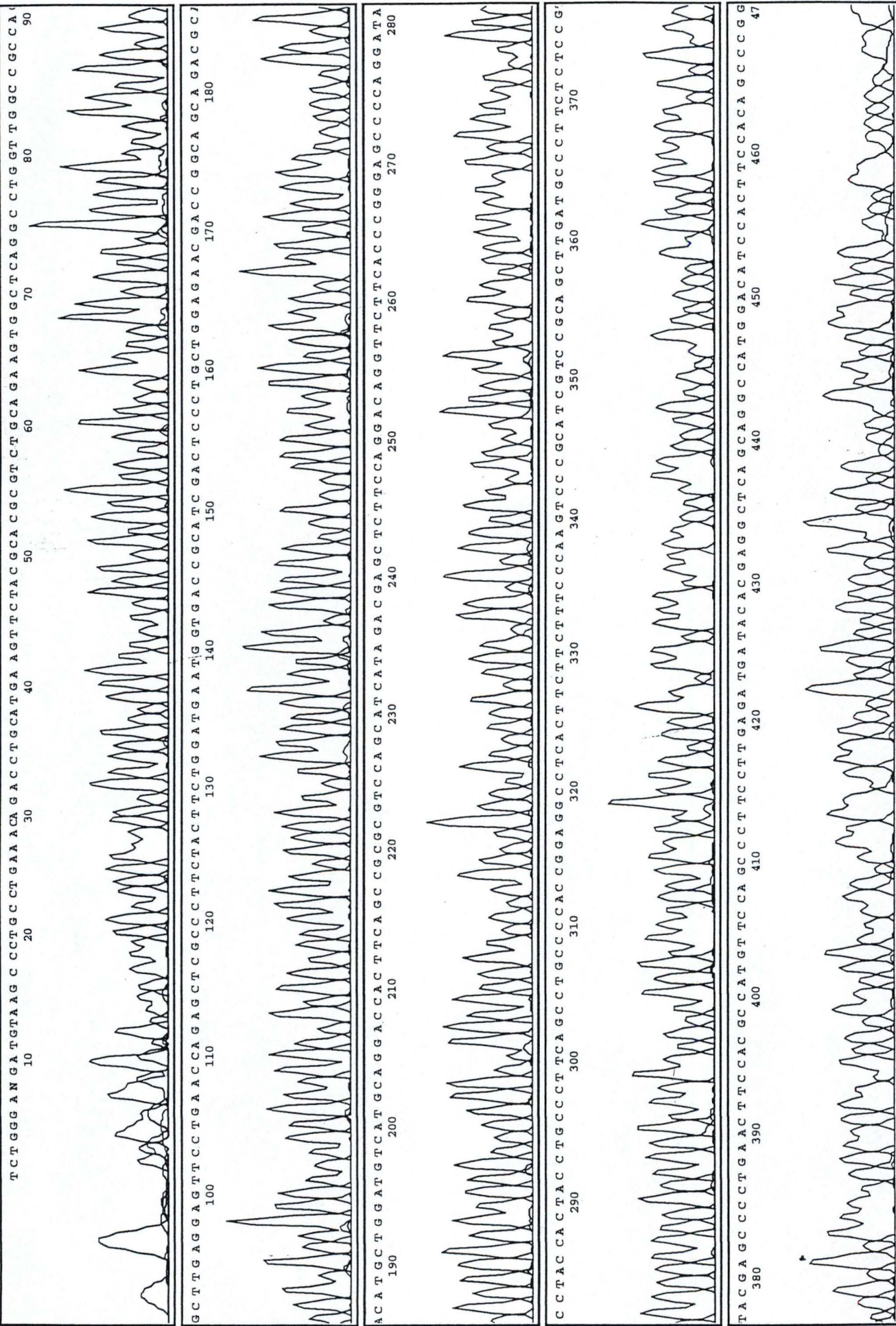


GC C C C T G A A C T T C C A C G C C A T G T T C C A G C C C T T C C T T G A G A T G A T A C A C G A G G C C T C A G C A G C C A T G G A C A T C C A C T T C C A C A G C C G G C C T T

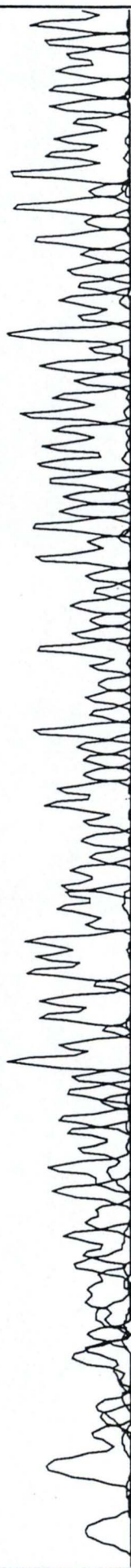




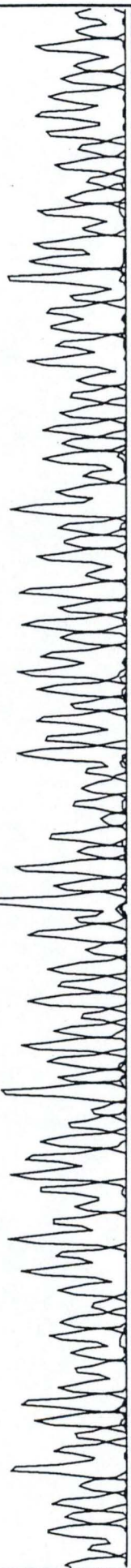




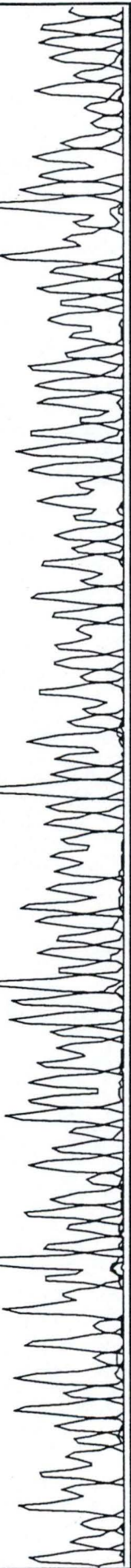
CTGC CC ACCGG AGGC CTCAC TCT TCTT CCAAGTCC CGCAT CGTC CGCAGCT TGGATGCCCT TCTCTCCGTACGAGCC CCGTGAAC T



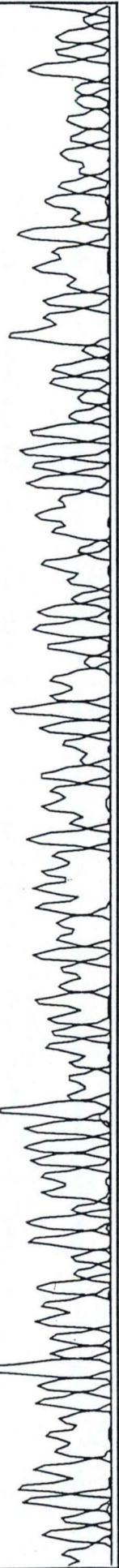
TCACGCCCATGT TCCAGC CCTTCCCTT GAGATGATACAC GAGGCTCA GCA GGGCA TGGACAT CCAC T TCCACAGC CCGGC CT TCCA GAC CCGCCAA



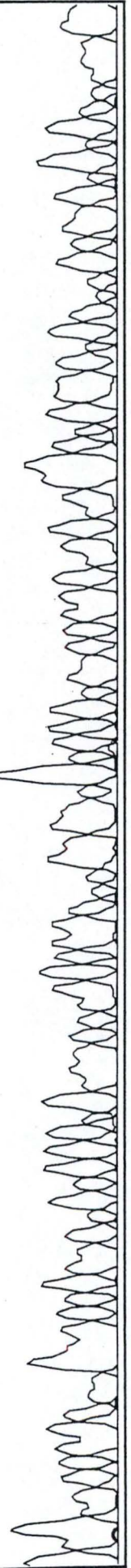
CAGAA TTCA TAC GAGAA GGC GAC GATGAC CCGAC TGTGTGCCCC GGGAGATC CGCCACAAC TCCAC GGGCTGCC CTGC GGATGAA GAGACCA GTGTGACA

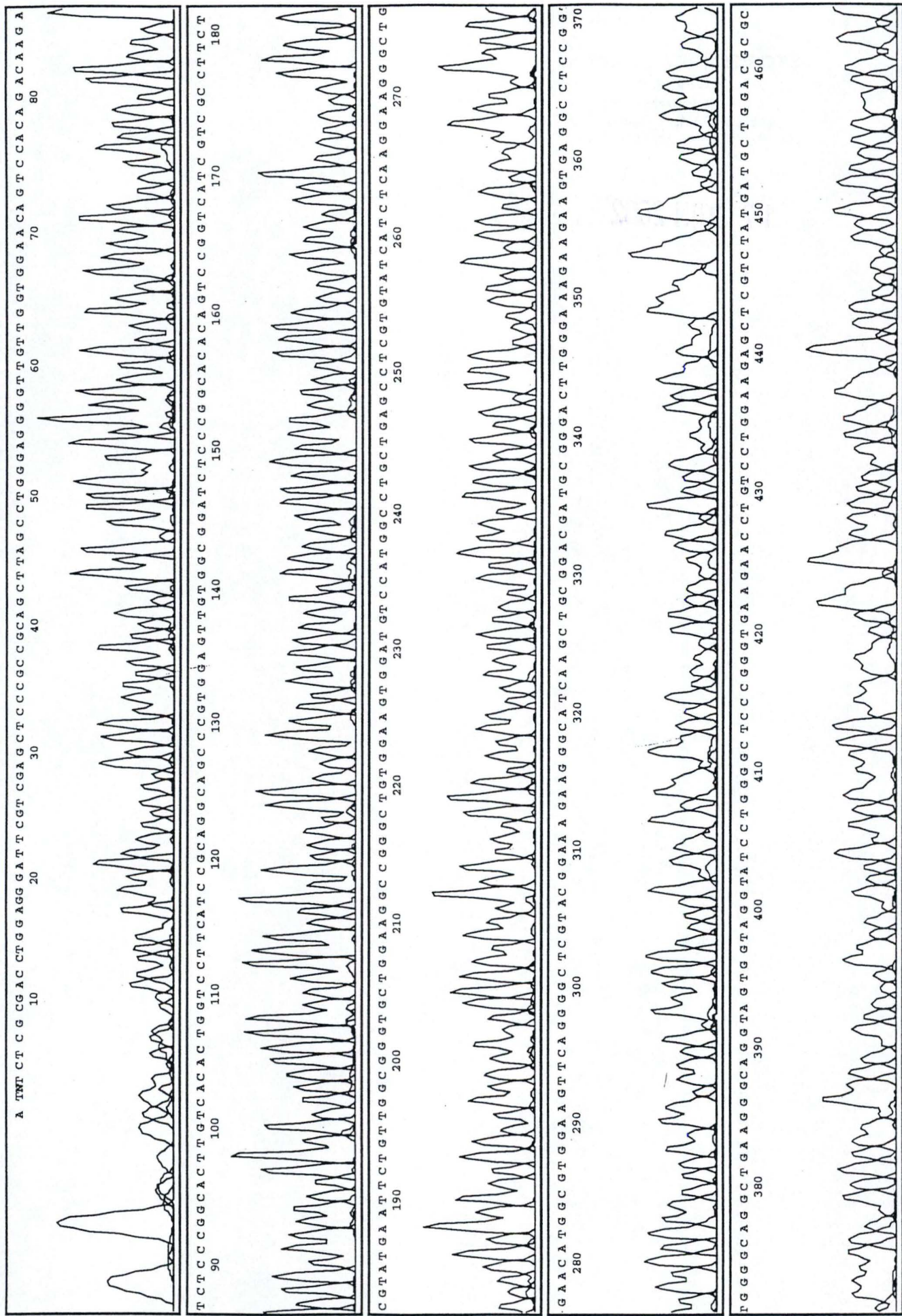


AGTGC CCGGAGA TCTTGTGTGTGGAC TGTTCACCAACAACCCCTCC CCAAGCTAA GCTGCGGC GGGAGCTCGACGAAATCCCTCCAGGTCCGCTGAGT



AGGT TGAC CAGGA ATACA AC GAGTGC TAAAGTCC TACCA GTGGAA GATGCTCAACA C TCCCTCCTTGCTGGAGCA GCTGAAC GAGCA GTTTAA





SECRETARIAT BIOLOGIE

F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59

B 5000 NAMUR (Belgique)

Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

17 JUIN 2002

X



20.045.911

